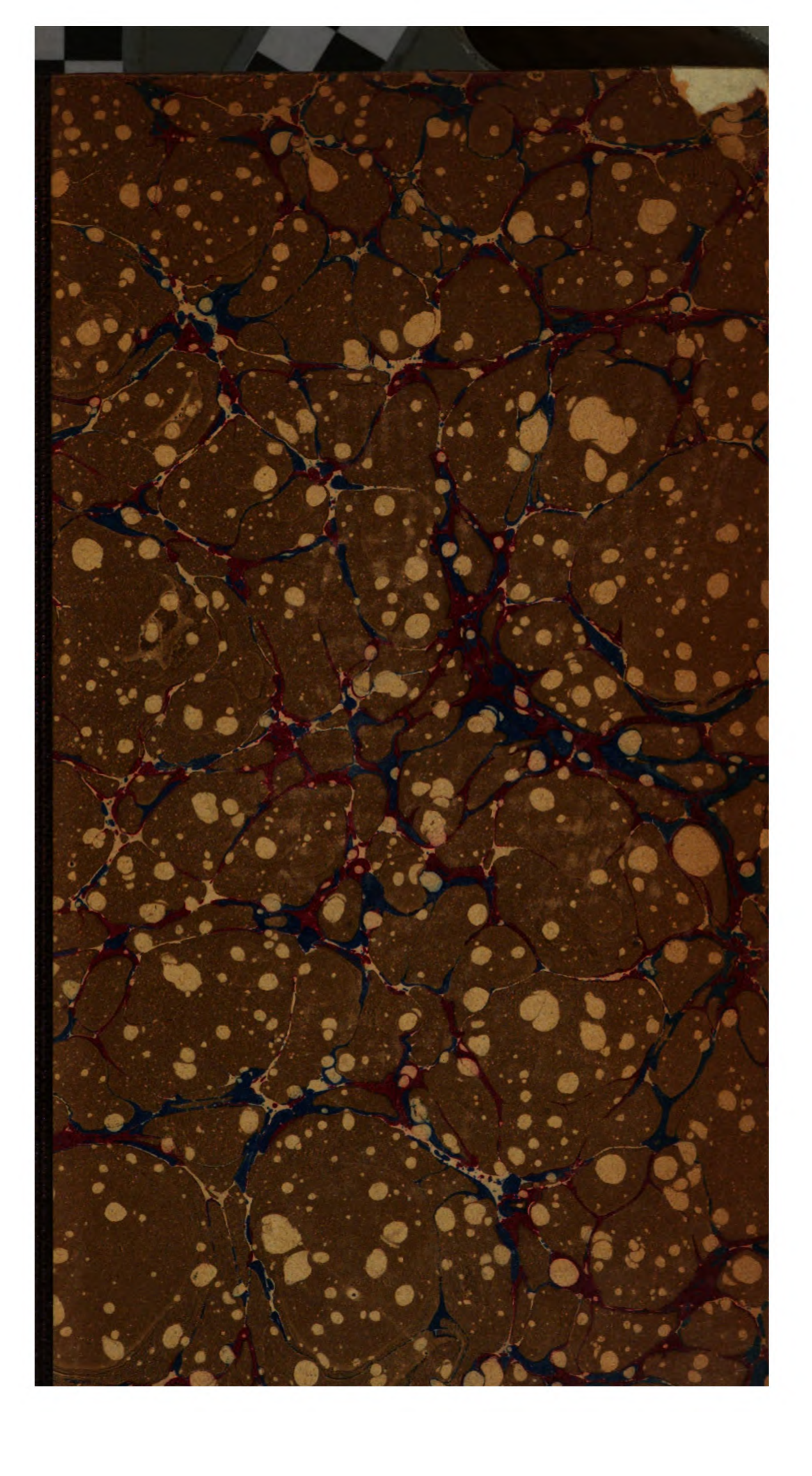
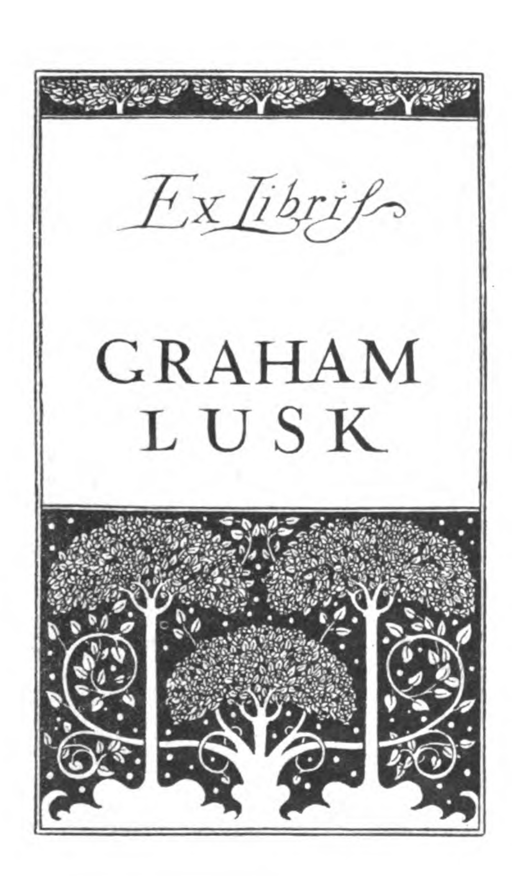



Ex Libris
GRAHAM
LUSK


CORNELL UNIVERSITY LIBRARY
3 1924 071 525 061


ANNEX
LIBRARY
B



Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, I. Bang-Lund, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, G. Embden-Frankfurt a. Main, S. Flexner-New York, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, U. Friedemann-Berlin, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, H. J. Hamburger-Groningen, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, R. Kobert-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, W. Loeb-Berlin, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Berlin, L. Michaelis-Berlin, J. Morgenroth-Berlin, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, F. Röhmann-Breslau, P. Rona-Berlin, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., A. Stutzer-Königsberg i. Pr., F. Tangl-Budapest, H. v. Tappeiner-München, H. Thoms-Berlin, J. Traube-Charlottenburg, A. J. J. Vandevelde-Gent, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Siebenundvierzigster Band.



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1912.

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Über die optimale Wasserstoffionenkonzentration bei der tryptischen Gelatineverflüssigung[1]).

Von

Sven Palitzsch und L. E. Walbum.

(Aus dem Carlsberg-Laboratorium, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 22. Oktober 1912.)

Mit 8 Figuren im Text.

1. Einleitung.

Zu einer vergleichenden Untersuchung der proteolytischen Wirkung verschiedener Flüssigkeiten wurde Fermis Gelatinemethode benutzt, und zwar diejenige Modifikation, die Th. Madsen und L. E. Walbum mehrere Jahre hindurch bei einer Reihe von nur teilweise publizierten Versuchen[2]) im staatlichen Seruminstitut in Kopenhagen angewandt haben. Die ersten durch diese — im folgenden auseinandergesetzte — Methode ausgeführten Versuche über den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die tryptische Gelatinespaltung gaben indessen das ganz unerwartete Resultat, daß die proteolytische Wirkung, die als eine Abnahme der Erstarrungsfähigkeit der Gelatine sich zu erkennen gab, sich desto stärker zeigte, je alkalischer die Versuchsflüssigkeit war. Da bei dem hier besprochenen Prozeß, der im folgenden der Kürze halber „Gelatineverflüssigung" benannt wird, eine enzymatische Spaltung sicherlich stattfindet, mußte das obengenannte Versuchsresultat wahrscheinlich von Fehlern der Methode herrühren.

---

[1]) Wird gleichzeitig in französischer Sprache in den Compt. rend. du Lab. de Carlsberg 9, 200, 1912 veröffentlicht.

[2]) Siehe Arrhenius, Immunochemie, S. 46 ff. 1907.

Da die Gelatinemethode übrigens sich sehr gut bewährt hat — besonders wenn es sich um den Nachweis oder die Bestimmung sehr kleiner Proteasemengen handelt —, und da das Verfahren bei klinischen und bakteriologischen Untersuchungen eine ausgedehnte Anwendung findet, erschien eine Erläuterung und Berichtigung eventueller Fehlerquellen wünschenswert. Eine solche unserem Zwecke entsprechende Untersuchung haben wir durchzuführen versucht, indem wir als proteolytisches Enzym „Pankreatin, Rhenania" verwendet haben. Obwohl es uns nicht gelungen ist, die vielen merkwürdigen Verhältnisse, die die Gelatineverflüssigung darbietet, zu erklären, glauben wir doch feststellen zu können, daß der oben berührte Mangel der Methode hauptsächlich davon herrührt, daß die Erstarrungsgeschwindigkeit der Gelatine von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung abhängig ist oder jedenfalls sein kann. Der Fehler läßt sich daher ohne große Mühe vermeiden: man hat einfach durch eine passende „Neutralisation" dafür zu sorgen, daß die Erstarrungsfähigkeit aller Proben derselben Versuchsreihe immer bei ein und derselben Wasserstoffionenkonzentration untersucht wird.

Bei Versuchen über den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf den in Rede stehenden proteolytischen Prozeß ist die Methode, wie es im folgenden näher besprochen werden wird, in noch einem Punkte zu ändern: es ist nämlich notwendig, einen passenden „Puffer" zuzusetzen, um die Wasserstoffionenkonzentration der verschiedenen Versuchsflüssigkeiten konstant zu halten.

Mittels der auf diese Weise geänderten Methode haben wir die optimale Wasserstoffionenkonzentration der tryptischen Gelatineverflüssigung bei verschiedenen Temperaturen bestimmt und dadurch im Anschluß an die von S. P. L. Sörensen[1]) dargelegten Anschauungen und in gutem Einklang mit den kürzlich von J. Boselli[2]) publizierten Versuchen über die Inulasewirkung eine deutliche Abhängigkeit der Versuchstemperatur von der optimalen Wasserstoffionenkonzentration nachweisen können, indem diese letztere von ca. $10^{-9,9}$ — bei der Versuchstemperatur 30° — mit zunehmender Temperatur ziem-

[1]) Diese Zeitschr. **21**, 283, 1909 und Ergebnisse der Physiol. **12**, 1912.

[2]) Annales de l'Inst. Pasteur **25**, 695, 1911.

lich erheblich gegen den Neutralpunkt hin verschoben wird, so daß sie bei 55° bei ca. 10^{-8} liegt.

Obwohl Bestimmungen der optimalen Wasserstoffionenkonzentration der tryptischen Gelatineverflüssigung bisher noch nicht vorliegen, finden sich doch einzelne Angaben in Betreff der proteolytischen Spaltung anderer Substrate in der Literatur. So hat z. B. Kurt Meyer[1]) für Casein und Bakterienproteasen (von Prodigiosus und Pyocyaneus) bei 37 bis 38° ein Optimum bei einer Wasserstoffionenkonzentration von $10^{-7,2}$ für Casein und Trypsin-Grübler bei derselben Temperatur bei ca. 10^{-8} gefunden. L. Michaelis und H. Davidsohn[2]), welche mit Pepton-Riedel und Trypsin-Rhenania arbeiteten, haben bei 37° 10^{-8} als die optimale Wasserstoffionenkonzentration angesetzt.

2. Die angewandte Methode.

A. Die historische Entwicklung der Methode.

Zu seinen Untersuchungen über proteolytische Enzyme benutzte Fermi[3]) Gelatine statt Fibrinflocken, die früher zum Nachweis dieser Enzyme angewandt wurden. Eine durch gelinde Erwärmung hergestellte Lösung von 5 bis 10%iger gewöhnlicher Gelatine in Wasser, das mit etwas Thymol bzw. Chloroform versetzt ist, wird in noch flüssigem Zustande in kleine Reagensgläschen gefüllt, so daß sie nur etwa ein Drittel des Glases einnimmt. Nach Erstarrung der Gelatine werden einige wenige Kubikzentimeter Enzymlösung darauf gegossen, und nach einigen Stunden oder am nächsten Tage ist dann die Gelatine ganz oder zum Teil verflüssigt, sofern die betreffende Enzymlösung die Gelatine hat spalten können.

Bei quantitativen Untersuchungen maß Fermi die Höhe der verflüssigten Gelatineschicht. Diese Messung ist jedoch eine zu ungenaue, um für feinere Untersuchungen einen brauchbaren Ausdruck der Enzymwirkung zu liefern. Der größte Nachteil besteht hier darin, daß Enzym und Gelatine einander bloß in einer Fläche berühren, weshalb die bereits gespaltene Gelatine die Wirkung des Enzyms hemmen könnte, ebenso

[1]) Diese Zeitschr. 32, 275 und 276, 1911.

[2]) Diese Zeitschr. 36, 280, 1911.

[3]) Arch. f. Hygiene 12, 242, 1891 und 55, 142, 1906.

wie Diffusion und ähnliche Verhältnisse von Belang sein können. Diese Fehler kann man dadurch größtenteils vermeiden, daß man die Enzymlösung mit der flüssigen Gelatine vermischt und die Versuche bei so hohen Temperaturen ausführt, daß die Gelatine nicht erstarrt. Nach Verlauf einer bestimmten Zeit wird die Mischung abgekühlt; eine enzymgespaltene Gelatine erstarrt dann langsamer oder gar nicht. Schon in seinen ersten Abhandlungen beschreibt Fermi diese Änderung als besonders vorzüglich zur Untersuchung fester enzymhaltiger Partikel[1]), bringt sie aber nur bei einigen Versuchen über den Einfluß der Säuren auf Bakterienproteasen[2]) in Anwendung. Erst viele Jahre später, nachdem die flüssige Gelatine von Duclaux, Malfitano, Madsen und Walbum und mehreren anderen benutzt war, betont Fermi[3]) sehr stark die Nachteile der Anwendung der flüssigen Gelatine. Fermi war es nämlich vor allen Dingen an dem Nachweis ganz kleiner Enzymmengen gelegen, und in solchem Falle ist selbstverständlich die erstarrte Gelatine vorzuziehen, weil die geringen Enzymspuren an der Oberfläche konzentriert werden können.

Wird die Methode in dieser Änderung ausgeführt, so kann die Menge der gespaltenen Gelatine selbstverständlich nicht in derselben Weise wie oben gemessen werden. Es ist aber leicht, die Methode zu quantitativen Messungen geeignet zu machen. Man hat dann nur die Enzymlösung in verschiedenem Maße zu verdünnen und darnach denjenigen Verdünnungsgrad zu ermitteln, der in einer bestimmten Zeit die Erstarrungsfähigkeit der Gelatine eben aufzuheben imstande ist. Dieser Verdünnungsgrad gibt außerdem einen viel korrekteren Ausdruck der Stärke der Enzymlösung als die ursprüngliche Methode, weil die Verdauung hier bis zu demselben Punkt in derselben Zeit geht, nur mit mehr oder minder verdünnten Enzymlösungen. In dieser Modifikation wurde Fermis Methode von Madsen und Walbum benutzt; übrigens findet die Methode in sehr verschiedenen Änderungen bei klinischen und bakteriologischen Untersuchungen häufig Anwendung.

---

[1]) Arch. f. Hygiene 12, 260, 1891.
[2]) Arch. f. Hygiene 14, 20, 1892.
[3]) Arch. f. Hygiene 55, 173, 1906.

B. Der Einfluß verschiedener Faktoren auf die Genauigkeit der Methode.

Bei den einleitenden Versuchen über die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die tryptische Gelatineverflüssigung ergab sich, wie bereits in der Einleitung erwähnt, daß die alkalischsten Gelatinelösungen am schnellsten die Erstarrungsfähigkeit einbüßten; es ließ sich keine Optimalwasserstoffionenkonzentration für die Enzymwirkung nachweisen. Da es wenig wahrscheinlich war, daß es keine solche Optimalkonzentration gäbe, und wie es auch nicht zu vermuten war, daß diese bei einer noch niedrigeren Wasserstoffionenkonzentration läge, als der bei den Versuchen angewandten, so war die Ursache folglich in Fehlern der benutzten Methodik zu suchen. Unter den möglichen Fehlerquellen haben wir unsere Aufmerksamkeit auf die nachstehenden vier gerichtet.

a) Die Abhängigkeit der Erstarrungsgeschwindigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration. In den obengenannten einleitenden Versuchen erfolgte die Erstarrung der Gelatine nach der Verdauung bei denselben Wasserstoffionenkonzentrationen wie die während der Verdauung vorhandenen. Wie es im Abschnitt 3 E (S. 26) durch eine Reihe Versuche näher erörtert werden wird, erstarrt eine stark alkalische Gelatinelösung langsamer als eine neutrale[1]). Dieses wird verursachen, daß die alkalischste Gelatinelösung längere Zeit hindurch flüssig bleibt, als die weniger alkalischen, selbst wenn sie so wenig gespalten ist, daß sie viel schneller erstarren würde, wenn nur die Wasserstoffionenkonzentration während der Erstarrung die gleiche in allen Proben gewesen wäre. Dieser Fehler der Methode ist durch Neutralisation sämtlicher Mischungen nach der Verdauung und unmittelbar vor der Abkühlung leicht zu vermeiden.

Gleich nach Einführung dieser Verbesserung konnte ein deutliches Optimum ermittelt werden, da jetzt die alkalischsten Lösungen erst nach sehr langer Verdauung die Erstarrungsfähigkeit einbüßten.

---

[1]) Beinahe alle früheren Untersuchungen über den Einfluß zugesetzter Stoffe auf die Erstarrungsfähigkeit der Gelatine wurden mit Salzen und nicht mit Säuren oder Basen angestellt.

Spätere Versuche zeigten allerdings, daß die Gegenwart der Borsäure, die wir der Gelatine aus anderen Gründen zusetzten (siehe S. 8), den Unterschied der Erstarrungsfähigkeit zwischen einer alkalischen und einer neutralen Gelatinelösung in hohem Grad vermindert; selbstverständlich ist es aber immer am richtigsten, wenn der Spaltungsgrad der einzige Faktor ist, der während der Erstarrung in derselben Reihe von Proben verschieden ist, und wir haben deswegen bei allen Hauptversuchen sämtliche Proben vor der Erstarrung neutralisiert.

b) Spaltung der Gelatine durch Hydroxylionen. Wie bekannt, wird die Erstarrungsfähigkeit der Gelatine durch lange dauerndes Kochen — namentlich in alkalischer oder saurer Lösung — sehr beträchtlich vermindert[1]).

Dieser Vorgang, der sich auch bei niedrigeren Temperaturen abspielt, obgleich in geringerem Maße, wird bewirken, daß die alkalischsten Lösungen eine längere Erstarrungszeit haben als die der enzymatischen Spaltung der Gelatine entsprechende, und das aus den Versuchen hervorgehende Optimum wird bei einer niedrigeren Wasserstoffionenkonzentration (einer alkalischeren Lösung) als der der optimalen Enzymwirkung entsprechenden liegen. Während der verhältnismäßig kurzen Zeiten und bei den Wasserstoffionenkonzentrationen, die wir bei unseren Hauptversuchen benutzt haben, wird diese Wirkung doch nicht groß genug sein, um das Ergebnis der Messung beeinflussen zu können. (Vergleiche die Versuche S. 29.)

c) Widerstand der genuinen Proteine gegenüber der Trypsinwirkung. Gewisse genuine Proteine, wie z. B. Serumalbumin und Eiereiweiß, vermag das Trypsin nur schwierig anzugreifen[2]). Eine kurzdauernde Erhitzung oder

---

[1]) Siehe z. B. P. Schroeders umfassende Arbeit, Zeitschr. f. physikal. Chem. 45, 75, 1903. Man erinnere sich, daß die Versuche Schroeders nur feststellen, daß die Gelatine bei Gegenwart der zugesetzten Stoffe durch Kochen in ungleichem Grad gespalten wird, wogegen er über die verschiedenen Erstarrungsgeschwindigkeiten der mit verschiedenen Stoffen versetzten Gelatine gar nichts aufklärt. Z. B. ist nicht ersichtlich, ob die Wasserstoffionenkonzentration während der Erstarrung Einfluß auf die Erstarrungsgeschwindigkeit hat. Die gemessenen Geschwindigkeiten beziehen sich nämlich auf Gelatine, die in sehr ungleichem Grad gespalten ist, mithin auf verschiedene Stoffe.

[2]) Siehe Abderhalden, Biochem. Handlexikon 5, 590, 1911, wo die betreffende Literatur angeführt ist.

Stehen mit Säuren oder Basen genügt indes oft, um diese Proteine in solcher Weise umzuwandeln, daß sie leicht vom Trypsin weiter abgebaut werden. Die Möglichkeit lag daher vor, daß die frische Gelatine nicht enzymatisch gespalten würde, ehe sie durch die Einwirkung von Hydroxylionen eine — vielleicht nur ganz geringfügige — Veränderung erlitten hatte. Da diese letztere Wirkung voraussichtlich mit steigender Hydroxylionenkonzentration vergrößert würde, so würden die am meisten alkalischen Mischungen zuerst vom Trypsin beeinflußt werden und infolgedessen am schnellsten die Erstarrungsfähigkeit verlieren, obwohl die Enzymspaltung für sich allein in diesen nicht so schnell vor sich gehen würde als in jenen, wo der niedrigeren Hydroxylionenkonzentration wegen die Widerstandsfähigkeit der Gelatine gegenüber der Wirkung des Trypsins erst viel später vernichtet werden würde.

Auch dieser Vorgang würde den gefundenen Optimalpunkt gegen die alkalische Seite hin verschieben; wenn man aber als Substrat eine Gelatinelösung benutzte, die vor dem Zusatz des Enzyms von Natriumhydroxyd gespalten war, würde dieser Fehler sehr geringfügig sein. Zwei Versuchsreihen, teils mit frischer Gelatine, teils mit durch 0,04 n-Natriumhydroxydlösung bei 37° in 20 Stunden gespaltener Gelatine, zeigten etwa dieselbe optimale Wasserstoffionenkonzentration (vgl. Tabellen X und XI), so daß es demnach wohl kaum anzunehmen ist, daß die frische Gelatine einen erheblichen Widerstand gegenüber der Trysinwirkung leistet.

d) Vergrößerung der Wasserstoffionenkonzentration während des Abbaus der Gelatine. Wenn Proteinstoffe durch Enzyme oder Hydroxylionen abgebaut werden, wird das basenbindende Vermögen eine Änderung erfahren. Eine alkalische Proteinlösung wird während eines solchen Abbaus allmählich weniger alkalisch werden, d. i. die Hydroxylionenkonzentration wird erniedrigt und folglich die Wasserstoffionenkonzentration vergrößert[1]).

Diese Änderung der Wasserstoffionenkonzentration ist bezüglich des Trypsins und Witte-Peptons bereits von S. P. L. Sörensen in Enzymstudien I[2]) erwähnt. T. Brailsford Ro-

[1]) Siehe übrigens S. P. L. Sörensen, Ergebn. d. Physiol. 12, 1912.

[2]) Diese Zeitschr. 7, 97, 1907 und 21, 194, 1909.

bertson und C. L. A. Schmidt[1]) haben die Änderung während des Abbaus des Caseins und Protamins durch Trypsin ermittelt, und in jüngster Zeit ist diese Änderung bei dem tryptischen Abbau der Gelatine durch elektrometrische Messungen im hiesigen Laboratorium bestimmt worden.

Als Beispiele können die folgenden zwei Versuche herangezogen werden. Eine Mischung[2]) von 40 ccm ca. 7%iger Gelatine, 2 ccm n-Natriumhydroxydlösung, 1,4 ccm n-Salzsäure, 4,6 ccm Wasser und 2 ccm 1%iges Trypsin wurde bei 30° verdaut, und während der Verdauung wurde die Wasserstoffionenkonzentration bei derselben Temperatur gemessen.

Nach

0	20	30	40	50	60	70	80	90	120	150

Minuten betrug p_H.

(9,30)	9,02	8,87	8,73	8,60	8,47	8,37	8,29	8,21	8,03	7,91.

Für eine ähnliche Mischung[3]), die nur 1,2 ccm statt 1,4 n-Salzsäure enthielt, betrug p_H. nach

0	10	20	30	40	50	60	70	100 Min.
(9,80)	9,68	9,58	9,48	9,33	9,24	9,14	9,03	8,65.

Wenn die Wasserstoffionenkonzentration während des Versuches sich in so hohem Maße veränderte, konnte die Bestimmung der optimalen Wasserstoffionenkonzentration kaum eine hinlänglich genaue sein. Ein Zusatz eines sogenannten „Puffers“, die dieser Änderung entgegenwirken könnte, war daher notwendig. Als Puffer bei Versuchen über die optimale Wasserstoffionenkonzentration der Trypsinwirkung, die ca. 10^{-9} beträgt, läßt sich Borsäure vorteilhaft anwenden, da diese, wie S. P. L. Sörensen festgestellt hat, eben bei Wasserstoffionenkonzentration von ca. 10^{-9} eine sehr erhebliche Pufferwirkung ausübt. Ein Versuch zeigte, daß p_H. nach Zusatz von 0,2 g/Mol Borsäure pro Liter einer der obigen ähnlichen Mischung sich im Laufe einer Stunde nur von 9,18 bis 9,16 änderte, ein für die vorliegende Untersuchung zu vernachlässigender Unterschied. Bei den Hauptversuchen wurden deshalb nur Gelatinelösungen, die in einem Liter 0,2 g/Mol Borsäure enthielten, benutzt.

[1]) Journ. of Biol. Chem. 5, 31, 1908.
[2]) Diese Mischung entspricht Nr. 6, Tabelle X.
[3]) Diese Mischung entspricht Nr. 5, Tabelle X.

3. Die Versuche.

A. Die benutzten Lösungen.

Um bei allen Bestimmungen mit derselben Konzentration der Gelatine und des Trypsins arbeiten zu können, wurde ein für allemal eine solche Menge von diesen Stoffen gelöst, daß sie für sämtliche Versuche genügte.

Die Trypsinlösung. 30 g Pankreatin-Rhenania wurden mit 250 ccm Wasser versetzt und nach Stehenlassen bei Zimmertemperatur einige Stunden unter häufigem Schütteln durch Papier filtriert; durch Waschen des Filters und des Rückstandes wurde das Volumen der Trypsinlösung auf 300 ccm gebracht, 10 ccm Toluol zugesetzt, die Lösung geschüttelt und im Eisschrank aufbewahrt. Ein voluminöser Niederschlag schied sich langsam aus, wurde aber aufgelöst, wenn diese 10%ige Lösung bis zu 1% verdünnt und das Toluol durch einen Wasserstoffstrom ausgetrieben wurde. Vor der Abpipettierung der für eine Versuchsreihe nötigen Trypsinmenge wurde der ausgeschiedene Niederschlag sorgfältig in der Flüssigkeit aufgeschüttelt, so daß man immer dieselbe Menge Niederschlag in der Pipette aufsog. Eine 1%ige Lösung wurde z. B. durch Verdünnung von 1 ccm mit 9 ccm Wasser dargestellt, und diese Lösung wurde binnen kurzer Zeit vollständig klar. 1 ccm einer 1%igen Lösung enthielt 0,87 mg Stickstoff. Die meisten Verdauungsversuche wurden mit Mischungen, die in 50 ccm 2 ccm 1%iger Trypsinlösung enthielten, angestellt; die Konzentration des Trypsins war demnach 0,4‰; außerdem wurden Lösungen mit 0,2 und 0,1‰ Trypsin untersucht.

Die Gelatinelösung wurde aus 1400 g französischer Gelatine dargestellt. Nach Aufquellung und Lösung in ca. 2,5 l lauwarmem Wasser wurde die sehr zähe Flüssigkeit durch ein Sieb gegossen und ca. 2 g in Wasser emulsioniertes Thymol und 25 ccm ca. 5 n-Natriumhydroxydlösung zugesetzt; die Gelatinelösung reagierte auf Lackmuspapier noch schwach sauer. Schließlich wurde die Lösung mit warmem Wasser bis zu 4000 ccm aufgefüllt und in 200 ccm Medizinflaschen eingegossen, die nach Zukorken im Eisschrank aufbewahrt wurden. 1 g dieser Gelatine enthielt 45 mg Stickstoff. (Wurden 100 g der Gelatinelösung mit 625 ccm Wasser verdünnt, so ergab die Messung von p_{H}. den Wert 5,8.)

Kurz vor Anwendung der Gelatine wurden 200 g dieser 35 %igen Lösung abgewogen und bis zu 1 l mit Wasser, in dem 15,5 g reine Borsäure gelöst waren, verdünnt. Behufs der Versuche wurden 40 ccm hiervon weiter bis zu 50 ccm verdünnt, so daß die Versuchsflüssigkeiten ca. 60 g Gelatine und 12,4 g Borsäure (= 0,2 g/Mol) in 1 l enthielten.

Die verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen der Mischungen wurden durch Zusatz verschiedener Mengen Natriumhydroxydlösung hervorgebracht. Die für die in den Tabellen III bis IX aufgeführten Versuche angewandten Mischungen waren aus 40 ccm der letztgenannten borsäurehaltigen Gelatinelösung und 2 ccm Trypsinlösung nebst den untenstehenden 8 ccm Natronlauge und Wasser dargestellt.

(1 ccm dieser Versuchsflüssigkeit enthielt 7,25 mg Stickstoff.)

Nr. 1	4,0 ccm	0,2	n-Natriumhydroxyd	und	4,0	ccm	Wasser
„ 2	7,0 „	0,2	„ „	„	1,0	„	„
„ 3	4,0 „	1	„ „	„	4,0	„	„
„ 4	6,0 „	1	„ „	„	2,0	„	„
„ 5	8,0 „	1	„ „	„	0,0	„	„
„ 6	5,0 „	2	„ „	„	3,0	„	„
„ 7	5,5 „	2	„ „	„	2,5	„	„
„ 8	6,0 „	2	„ „	„	2,0	„	„

Saurere Lösungen als Nr. 1 ($p_{H^{\cdot}}$ = ca. 7,3) wurden nicht benutzt, weil die Borsäure in solchen Lösungen nicht als Puffer wirkt, und deswegen die Wasserstoffionenkonzentration sich während der Versuche zu viel verändern könnte.

Die Neutralisationsmischungen, von denen 1 ccm zu 5 ccm Gelatinemischung benutzt wurde, enthielten so viel Salzsäure, daß die Versuchsflüssigkeiten nach dem Zusatz auf Lackmuspapier neutral reagierten[1]).

Die in den Tabellen X und XI aufgeführten Mischungen bestanden aus 40 ccm zirka 7 %iger Gelatine, nur ohne Borsäure, und 2 ccm 1 %igem Trypsin nebst 2 ccm n-Natriumhydroxyd (die Menge mitgerechnet, mit der die für die in Tabelle XI aufgeführten Versuche

[1]) In den neutralisierten Gelatinemischungen ist freilich ein Unterschied im Gehalt an Natriumchlorid vorhanden; einige Versuche zeigten jedoch, daß die hier in Betracht kommenden Salzmengen unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Änderung der Erstarrungsgeschwindigkeit bewirkten.

angewandte Gelatine vor dem Zusatz des Trypsins behandelt wurde) und den folgenden Mengen Salzsäure und Wasser.

Nr.	1	0,0	ccm	n-Salzsäure	und	6,0	ccm	Wasser
„	2	0,4	„	„	„	5,6	„	„
„	3	0,8	„	„	„	5,2	„	„
„	4	1,0	„	„	„	5,0	„	„
„	5	1,2	„	„	„	4,8	„	„
„	6	1,4	„	„	„	4,6	„	„
„	7	1,6	„	„	„	4,4	„	„
„	8	1,8	„	„	„	4,2	„	„
„	9	2,0	„	„	„	4,0	„	„

Die entsprechenden Neutralisationsmischungen enthielten so viel Salzsäure, daß die ganze zugesetzte Natriumhydroxydmenge neutralisiert wurde.

B. Messung und Berechnung der Wasserstoffionen- und der Hydroxylionenkonzentrationen.

Alle Bestimmungen der Wasserstoffionenkonzentrationen wurden mittels der elektrometrischen Methode ausgeführt, wie diese gewöhnlich im hiesigen Laboratorium[1]) benutzt wird. Obgleich die Flüssigkeiten nicht kohlensäurehaltig waren, wurde doch das von Hasselbalch[2]) konstruierte Elektrodengefäß benutzt, da dieses nur eine geringe Menge Lösung erfordert und ein schnelles und bequemes Wechseln der Flüssigkeit zuläßt. Die Platinelektrode wurde mit Wasserstoff gesättigt, bevor die Flüssigkeit in das Gefäß eingefüllt wurde, und während der Messung wurde Wasserstoff durchgeleitet.

Sowohl das Elektrodengefäß wie auch die Kalomelelektrode und die gesättigte Kaliumchloridlösung wurden in einen großen, mit Wassermantel und Quecksilberregulator ausgestatteten Luftthermostat eingestellt. In dem Thermostat war auch eine kleine Waschflasche aufgehängt, durch die der Wasserstoff strich, um mit Wasserdampf bei der betreffenden Temperatur gesättigt zu werden, bevor er durch die Gelatinelösung ging. Die Messungen wurden bei 30°, 37°, 45° und 55° ausgeführt, eben denselben Temperaturen, die bei den Verdauungsversuchen benutzt wurden.

Als „Meßbrücke“ wurden zwei übereinstimmende Rheostaten und als Nullinstrument ein verschlossenes evakuiertes

---

[1]) S. P. L. Sörensen, diese Zeitschr. **21**, 150, 1909.

[2]) K. A. Hasselbalch, diese Zeitschr. **30**, 317, 1910.

Capillarelektrometer (nach **Luther**, Modell **Ostwald**) angewandt.

Die Berechnung der Wasserstoffionenkonzentration ist mittels der folgenden Gleichung[1]) durchgeführt:

$$p_{H^{\cdot}} = \frac{\pi - \pi_0}{0{,}0577 + 0{,}0002\,(t - 18)}.$$

t ist die Temperatur in Celsiusgraden, π ist die für die Gelatinemischung gemessene Spannung, und π_0 ist die Spannung bei derselben Temperatur von einer Lösung, die $10^0 = 1$ g/Äquiv. Wasserstoff als Ionen in 1 l enthält.

Die Werte von π_0 bei verschiedenen Temperaturen wurden jüngst mit großer Genauigkeit von R. **Koefoed**[2]) bestimmt. π_0 bei 30°, 37°, 45° uud 55° wurden durch graphische Interpolation der Zahlen R. **Koefoeds** zu bzw. 0,3364, 0,3355, 0,3340, 0,3309 Volt gefunden. (Bei denselben Temperaturen ist der Nenner des obenstehenden Bruches 0,0601, 0,0615, 0,0631, 0,0651.)

Da das Produkt der Wasserstoff- und der Hydroxylionenkonzentration in wässeriger Lösung bei konstanter Temperatur gleich ist, kann die eine Konzentration aus der anderen berechnet werden, wenn dieses Produkt, die sogenannte Dissoziationskonstante des Wassers, bekannt ist.

Im Carlsberg Laboratorium ist diese Konstante bisher nur für 18° bestimmt worden. Bei dieser Temperatur ist als Mittelzahl einer großen Reihe Messungen $10^{-14,14}$ gefunden. Von diesem Wert ausgehend, läßt sich die Konstante bei anderen Temperaturen mittels der thermodynamischen Gleichung für Reaktionsisochoren berechnen, wenn die Dissoziationswärme sowie die Abhängigkeit derselben von der Temperatur bekannt sind.

Mittels einer solchen Berechnung, deren Einzelheiten hier zu erörtern zu weit führen würde, findet man, daß die Dissoziationskonstante $[= 10^{-(p_{H^{\cdot}} + p_{OH'})}]$

bei	30°	37°	45°	55°	
	$10^{-13,73}$	$10^{-13,52}$	$10^{-13,29}$	$10^{-13,02}$	beträgt.

[1]) S. P. L. **Sörensen**, diese Zeitschr. 21, 153 und 160, 1909.

[2]) Die Resultate sind vorläufig nur bei K. A. **Hasselbalch** und Chr. **Lundsgaard**, diese Zeitschr. 38, 81, 1912 und S. P. L. **Sörensen**, Ergebn. d. Physiol. 12, 1912 veröffentlicht.

Der Hydroxylionenexponent — $p_{OH'}$ — ist mühelos aufzufinden; man subtrahiert nur den Wasserstoffionenexponent — $p_{H^{\cdot}}$ — von den oben ausgerechneten Exponenten.

In Tabelle I sind die Werte für $p_{H^{\cdot}}$ und in Tabelle II die entsprechenden Werte für $p_{OH'}$ bei den Temperaturen 30°, 37°, 45°, 55° für die S. 10 genannten, 0,4‰ wirksames Trypsin enthaltenden Mischungen aufgestellt.

Bei 45° wurden zwei Messungen der Wasserstoffionenkonzentration in 0,1‰ Trypsin enthaltenden Lösungen ausgeführt; da die Enzymlösung schwach sauer, war $p_{H^{\cdot}}$ hier ein wenig größer als in den entsprechenden Mischungen mit 0,4‰ Trypsin. Der Unterschied war jedoch so gering, daß die Werte von $p_{H^{\cdot}}$ für die übrigen Mischungen, sowie für die 0,2‰ Trypsin enthaltenden Mischungen mit hinlänglicher Genauigkeit hieraus berechnet werden konnten. Der Unterschied zwischen den Werten — im $p_{H^{\cdot}}$ ausgedrückt — der Mischungen mit 0,1‰ und derjenigen mit 0,4‰ Trypsin betrug 0,04 und 0,07. Die Werte von $p_{H^{\cdot}}$ für die übrigen Mischungen mit 0,1‰ Trypsin sind daher durch Addition von 0,05 zu den für die Lösungen mit 0,4‰ Trypsin gemessenen Werten berechnet. Für die Lösungen mit 0,2‰ Trypsin sind die in den Tabellen VII und VIII angegebenen Werte durch Addition von 0,03 zu den für Gelatinemischungen mit 0,4‰ Trypsin gemessenen $p_{H^{\cdot}}$ berechnet.

In Tabelle I ist außerdem der Betrag der Änderung beigefügt, die die Wasserstoffionenkonzentration nach der für die verschiedenen Verdauungsversuche verwendeten Zeit erfahren hat. Aus der Tabelle erhellt, daß die zugesetzte Borsäure die Änderung so stark vermindert hat, daß dieselbe bei der Bestimmung der Optimalzone zu vernachlässigen ist. Abgesehen von einzelnen Ausnahmen, beträgt die Änderung nur 0,025 oder darunter, was etwa 1,5 Millivolt in der gemessenen Spannung entspricht.

Obschon die Wasserstoffelektrode vor der Messung mit Wasserstoff gesättigt wird, verfließen dennoch einige — bisweilen bis zu 20 — Minuten, ehe die gemessene Spannung die der Wasserstoffionenkonzentration entsprechende Größe erreicht, und im Laufe dieser Zeit wird sich $p_{H^{\cdot}}$ bereits verändert haben; da die Änderung aber beinahe proportional der Zeit verläuft[1]) — jedenfalls zu Anfang der Verdauung und bei den hier benutzten Wasserstoffionenkonzentrationen —, so läßt sich $p_{H^{\cdot}}$ in dem Augenblick, wo Gelatine und Trypsin gemischt

[1]) Vgl. S. 8.

wurden, ohne Schwierigkeit berechnen. In Tabelle I sind die für den Anfang des Versuchs berechneten Werte zusammengestellt, und dieses $p_{H^{\cdot}}$, vermindert um die beigefügte Differenz, gibt dann $p_{H^{\cdot}}$ beim Schluß des Versuchs.

Behufs der Versuche mit Gelatine ohne Borsäure wurden die elektrometrischen Messungen in Mischungen mit gekochtem Enzym ausgeführt. Die so gemessenen Wasserstoffionenkonzentrationen waren beinahe dieselben wie die durch Extrapolation gefundenen Anfangskonzentrationen einiger entsprechenden Mischungen mit wirksamem Enzym.

C. Die Ausführung der Versuche.

In je 100 ccm fassende Kjeldahlkolben von Jenaglas wurden 40 ccm der verdünnten borsäurehaltigen Stammgelatine nebst 8 ccm der S. 10 genannten Mischungen von Wasser und Natriumhydroxydlösung abgemessen. Nach ca. 20 Minuten Vorwärmen wurden 2 ccm Trypsinlösung zugesetzt und die Mischung gut geschüttelt. Während der Verdauung standen die Mischungen in einem Wasserthermostat, der mit einem Toluolregulator und elektrisch betriebenen Rührer versehen war.

Das Trypsin wurde nicht vorgewärmt, da einige Versuche zeigten, daß die Abkühlung durch Zusatz der kalten Enzymlösung sehr gering war, und daß die Temperatur in weniger als 1 Minute ausgeglichen wurde. Vorwärmen des Enzyms wird außerdem eine Unsicherheit in der Untersuchung verursachen, weil das Trypsin bereits bei 37° in erheblichem Maße zerstört wird. Da das Enzym nicht gleichzeitig allen Mischungen zugesetzt werden kann, sondern dies in Zwischenräumen von je $^1/_2$ Minute zu erfolgen hat, so würde die wirksame Enzymmenge in den letzten Proben geringer sein als in den ersten.

Nach Verlauf der in den Tabellen aufgeführten Zeiten[1]) wurde jeder Mischung eine Probe von 5 ccm entnommen und in dünnwandige Reagensgläser (Durchmesser 21 bis 22 mm) abpipettiert, die 1 ccm Neutralisationsmischung (siehe S. 10)

[1]) Die Entnahme der Probe wurde 5 Sekunden vor Ablauf der Reaktionszeit in Angriff genommen; die Einführung in das Reagensglas und das Schütteln waren gewöhnlich weniger als 5 Sekunden nach dem Verlauf der angegebenen Zeit vollzogen.

enthielten und mindestens 10 Minuten in einer Mischung von Eis und Wasser gestanden hatten. Nach gutem Schütteln wurde die neutralisierte Gelatinemischung 15 Minuten lang ohne Schütteln abgekühlt, wonach die Konsistenz beurteilt wurde. Um Kurven über die Versuchsergebnisse zeichnen zu können und um die Übersicht zu erleichtern, ist diese Beurteilung in Zahlen ausgedrückt.

Die Zahlen, die angeben, in welchem Grade die Erstarrungsfähigkeit der Gelatine abgenommen hat, und daher einen Ausdruck der Größe der stattgefundenen proteolytischen Spaltung geben, werden der Kürze halber der „Verflüssigungsgrad" benannt. Der Verflüssigungsgrad

0 bedeutet vollständig starr; der Gelatineklumpen wird selbst durch kräftiges Schütteln nicht losgemacht.

1 bedeutet starr; durch starkes Schütteln kann ein wenig losgerissen werden.

2 bedeutet starr; wird aber leichter zerrissen.
3 „ starr; die Oberfläche bewegt sich beim Schütteln.
4 „ wird leicht zerrissen.
5 „ beinahe weich.
6 „ weich.
7 „ sehr weich.
8 „ beinahe halbflüssig.
9 „ halbflüssig.
10 „ dickflüssig.
11 „ beinahe flüssig.
12 „ dünnflüssig.

Der Unterschied zwischen diesen Werten, deren Bestimmung auf einer persönlichen Schätzung beruht, könnte allzu unbedeutend erscheinen, um nur einigermaßen sicher beobachtet werden zu können. Bei den Versuchen ergab sich jedoch, daß man bei einer einzelnen Reihe Proben zweifellos feststellen konnte, ob eine Probe weicher oder starrer als die vorige war, und daß keineswegs zu viele Grade aufgestellt waren. Wie jede Bestimmung, die schätzungsweise entschieden wird, erfordert auch diese einige Übung, um eine gleichartige Ablesung zu ergeben. Für verschiedene Reihen Gelatineproben kann die Bestimmung allerdings etwas variieren, so daß man sich

nicht darauf verlassen kann, daß z. B. die Zahl 4 auch bei anderen Versuchen, an einem anderen Tag gemacht, ganz derselben Konsistenz entspricht; jedoch ist dieser Unterschied der Beurteilung nicht größer, als daß die den Zahlen 0, 1, 3, 6, 9, 11, 12 entsprechenden Verflüssigungsgrade mit Sicherheit auseinander gehalten werden können.

Wie man sehen wird, läßt sich die Messung durch diese Methode überaus leicht und schnell ausführen: Borsäurehaltige Gelatinelösungen mit bekannter Wasserstoffionenkonzentration werden auf die gewünschte Temperatur erwärmt; das Enzym wird dann zugesetzt, und nach Verlauf einer passenden Zeit werden 5 ccm jeder Lösung entnommen und in Reagensgläser abpipettiert, die im voraus abgekühlt sind und 1 ccm einer solchen Salzsäurelösung, die die 5 ccm Gelatinemischung neutralisieren kann, enthalten. Nach Stehenlassen im Eiswasser während 15 Minuten werden die Gläser herausgenommen und der Verflüssigungsgrad beurteilt.

Diese Methode, die für Untersuchungen geringer Enzymwirkungen besonders geeignet ist, besitzt zugleich den Vorzug, daß der Puffer, der nötig ist, um die Wasserstoffionenkonzentration während der tryptischen Spaltung unverändert zu halten, ihre Benutzung nicht erschwert. Wegen dieses zugesetzten Puffers kann die Formoltitrierung zur Untersuchung proteolytischer Spaltungen, die bei einer dem Optimum der Gelatineflüssigung entsprechenden Wasserstoffionenkonzentration ($p_{H^{\cdot}}$ = ca. 9) stattfinden, nicht leicht benutzt werden. Bei der Formoltitrierung titriert man nämlich, bis die zu untersuchende Flüssigkeit beinahe eben diese Wasserstoffionenkonzentration bekommt, und ein Puffer, der die Wasserstoffionenkonzentration während der Verdauung unverändert bewahrt, wird dann meistens verursachen, daß die Wasserstoffionenkonzentration während der Titrierung sich durch Zusatz der Natriumhydroxydlösung nur sehr wenig ändert; mit anderen Worten, die Titrierung wird unscharf.

Bei der Untersuchung der Gelatineverflüssigung kommt übrigens noch ein Verhältnis hinzu, daß die Anwendung der Gelatinemethode rechtfertigt. Während der Zeit, in der die

Gelatine so umgewandelt wird, daß die Erstarrungsfähigkeit verloren geht, werden nämlich so wenige Peptidbindungen aufgespalten, daß die Formoltitrierung in diesem speziellen Falle nicht so deutliche und genaue Resultate wie die Beurteilung des Verflüssigungsgrades geben kann.

Das folgende Beispiel wird dieses Verhältnis näher erläutern. Eine Mischung von 8 × 40 ccm ca. 7%iger Gelatine (200 g Stammlösung auf 1000 ccm verdünnt), 8 × 1,1 ccm n-Salzsäure, 8 × 2,0 ccm n-Natriumhydroxydlösung, 8 × 4,9 ccm Wasser und 8 × 2,0 ccm 1%iger Trypsinlösung wurde bei 30° in der unten angegebenen Anzahl Minuten verdaut. Dieser Mischung wurde kein Puffer zugesetzt und folglich ändert sich die Wasserstoffionenkonzentration während der Verdauung. 20 ccm der verdauten Mischung wurden mit 20 ccm Wasser verdünnt, neutralisiert und mit 0,2 n-Natronlauge formoltitriert[1]).

Minuten	0	30	34	40	50	60
$p_{H^{\cdot}}$	10,0	9,6	—	9,5	9,3	9,2
ccm 0,2n-NaOH bei der Formoltitrierung verwendet	2,2	2,5	—	—	—	2,8
Verflüssigungsgrad	0	2	5	8	12	12

D. Tabellen und Kurven.

In den Tabellen III bis IX sind die Ergebnisse unserer sieben Versuchsreihen zusammengestellt, die die Lage der optimalen Wasserstoffionenkonzentration bei den Temperaturen 30°, 37°, 45° und 55° bestimmen. Die Enzymkonzentration der ersten vier Versuche beträgt 0,4‰, der nächsten zwei 0,2‰ und des letzten 0,1‰. Die Zahlen der obersten, wagerechten Reihe geben die Verdauungszeit in Minuten, die Nummern in der ersten senkrechten Kolonne beziehen sich auf die Mischungen von Natriumhydroxyd und Wasser (S. 10); für jede Mischung ist zugleich die Konzentration (durch den Potenzexponenten ohne Vorzeichen ausgedrückt) sowohl der Wasserstoffionen als auch der Hydroxylionen vermerkt.

Die Tabellen X und XI zeigen die Resultate der mit Gelatine und ohne Borsäure angestellten Versuche, und die für $p_{H^{\cdot}}$ und $p_{OH'}$ angegebenen Werte entsprechen daher nur der zu Anfang des Versuchs bestehenden Wasserstoff- und Hydroxylionenkonzentration (vgl. S. 8). Bei Tabelle X ist frische Gelatinelösung benutzt, bei Tabelle XI dagegen eine Gelatine-

[1]) S. P. L. Sörensen, diese Zeitschr. 7, 45, 1907.

lösung, die in einer ca. 7 %igen Lösung 20 Stunden lang bei 37° unter Einwirkung von 0,04 n-Natriumhydroxyd gestanden hatte.

Die Kurven der Figuren 1 bis 7 sind mit den Werten von $p_{H^{\cdot}}$ als Abszisse und den Verflüssigungsgraden als Ordinate gezeichnet. Für jede Temperatur sind eine Reihe Kurven gezeichnet; die einzelnen Kurven sind durch die Punkte gelegt, die für die gleiche Zeit ermittelt sind, und die Zahlen bei den Kurven geben die Reaktionszeit in Minuten. Wie man sehen wird, liegt der Scheitelpunkt der Kurven, der der optimalen Wirkung entspricht, bei gleicher Temperatur beinahe bei derselben Wasserstoffionenkonzentration. Die Fig. 8 zeigt die Verschiebung der optimalen Wasserstoffionenkonzentration mit steigender Temperatur; $p_{H^{\cdot}}$ ist Abszisse und die Temperatur ist Ordinate.

Tabelle I.

Die Wasserstoffionenkonzentration, in $p_{H^{\cdot}}$ ausgedrückt, der benutzten Gelatinemischungen und die Änderung des $p_{H^{\cdot}}$ während der Verdauung.

Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8
ccm n-NaOH in 50 ccm Mischung		0,8	1,4	4,0	6,0	8,0	10,0	11,0	12,0
30°	$p_{H^{\cdot}}$	7,44	7,84	8,76	9,18	9,61	10,25	10,98	11,86
	Änderung nach 50′	0,011	—	0,017	0,020	0,010	0,070	0,050	0,015
37°	$p_{H^{\cdot}}$	7,39	—	8,65	9,08	9,52	10,06	10,70	11,47
	Änderung nach 50′	0,027	—	0,040	—	—	0,016	0,028	0,010
45°	$p_{H^{\cdot}}$	7,28	7,65	8,57	9,02	9,43	9,83	10,45	11,17
	Änderung nach 30′	0,026	0,022	0,022	0,017	0,024	0,020	0,020	0,016
55°	$p_{H^{\cdot}}$	7,23	7,60	8,45	8,91	—	9,77	—	—
	Änderung nach 30′	0,017	0,032	0,012	0,018	—	0,006	—	—
45° (0,1 ‰ Trypsin)	$p_{H^{\cdot}}$	—	—	—	9,06	9,50	—	—	—
	Änderung nach 90′	—	—	—	0,012	—	—	—	—

Tabelle II.

Die Hydroxylionenkonzentration, in $p_{OH'}$ ausgedrückt, der benutzten Gelatinemischungen.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	$p_{H^{\cdot}} + p_{OH'}$
Temp.: 30°	6,29	5,89	4,97	4,55	4,12	3,48	2,75	1,87	13,73
„ 37°	6,13	—	4,87	4,44	4,00	3,46	2,82	2,05	13,52
„ 45°	6,01	5,64	4,72	4,27	3,86	3,46	2,84	2,12	13,29
„ 55°	5,79	5,42	4,57	4,11	—	3,25	—	—	13,02

Tabelle III.

Der Verflüssigungsgrad der trypsinverdauten Gelatine.
($0{,}4\,^0/_{00}$ Trypsin; 30°.)

Nr.	$p_{H^\cdot}$	$p_{OH'}$	Verdauungszeit in Minuten						
			20	30	34	38	42	46	50
1	7,44	6,29	0	0	0	0	1	1	1
2	7,84	5,89	0	0	0	1	1	2	3
3	8,76	4,97	0	1	1	3	4	5	6
4	9,18	4,55	0	2	2	4	6	7	8
5	9,61	4,12	1	3	5	6	7	8	9
6	10,25	3,48	1	3	3	5	6	8	9
7	10,98	2,75	0	2	2	3	4	5	7
8	11,86	1,87	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle IV.

Der Verflüssigungsgrad der trypsinverdauten Gelatine.
($0{,}4\,^0/_{00}$ Trypsin; 37°.)

Nr.	$p_{H^\cdot}$	$p_{OH'}$	Verdauungszeit in Minuten								
			14	18	22	26	30	34	38	42	46
1	7,39	6,13	0	0	0	1	3	5	6	7	9
2	7,75	5,77	0	0	1	2	3	5	6	8	10
3	8,65	4,87	1	2	2	5	6	8	9	11	12
4	9,08	4,44	1	2	3	5	7	8	10	12	12
5	9,52	4,00	2	2	3	6	8	9	11	12	12
6	10,06	3,46	1	2	3	6	8	9	10	12	12
7	10,70	2,82	1	1	2	2	3	3	6	8	11
8	11,47	2,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle V.

Der Verflüssigungsgrad der trypsinverdauten Gelatine.
($0{,}4\,^0/_{00}$ Trypsin; 45°.)

Nr.	$p_{H^\cdot}$	$p_{OH'}$	Verdauungszeit in Minuten						
			6	10	14	18	22	26	30
1	7,28	6,01	0	1	1	3	6	9	12
2	7,65	5,64	0	1	2	4	8	11	12
3	8,57	4,72	0	3	4	6	9	12	12
4	9,02	4,27	1	3	5	6	9	12	12
5	9,43	3,86	0	2	2	6	9	12	12
6	9,83	3,46	0	1	1	2	6	7	12
7	10,45	2,84	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle VI.

Der Verflüssigungsgrad der trypsinverdauten Gelatine.
(0,4 °/₀₀ Trypsin; 55°.)

Nr.	$p_{H^\cdot}$	$p_{OH'}$	Verdauungszeit in Minuten							
			6	10	14	18	22	26	30	34
1	7,23	5,79	0	1	5	7	11	12	12	12
2	7,60	5,42	0	2	5	8	12	12	12	12
3	8,45	4,57	0	2	6	8	12	12	12	12
4	8,91	4,11	0	1	5	7	9	12	12	12
5	9,35	3,67	1	2	5	6	7	11	12	12
6	9,77	3,25	1	2	2	2	2	3	4	6
7	10,30	2,72	0	1	1	1	1	1	1	1

Tabelle VII.

Der Verflüssigungsgrad der trypsinverdauten Gelatine.
(0,2 °/₀₀ Trypsin; 37°.)

Nr.	$p_{H^\cdot}$	$p_{OH'}$	Verdauungszeit in Minuten				
			70	80	90	100	120
1	7,42	6,10	2	3	3	5	9
2	7,78	5,74	3	3	5	6	10
3	8,68	4,84	5	6	7	9	12
4	9,11	4,41	5	6	8	10	12
5	9,55	3,97	6	7	9	11	12
6	10,09	3,43	6	7	8	10	12
7	10,73	2,79	2	2	3	5	6
8	11,50	2,02	0	0	0	0	0

Tabelle VIII.

Der Verflüssigungsgrad der trypsinverdauten Gelatine.
(0,2 °/₀₀ Trypsin; 45°.)

Nr.	$p_{H^\cdot}$	$p_{OH'}$	Verdauungszeit in Minuten						
			30	40	50	60	70	80	90
1	7,31	5,98	0	2	5	6	7	9	10
2	7,68	5,61	1	4	6	7	8	10	12
3	8,60	4,69	2	4	7	8	10	12	12
4	9,05	4,24	2	5	7	9	11	12	12
5	9,46	3,83	3	6	8	9	11	12	12
6	9,86	3,43	2	4	6	7	10	11	12
7	10,48	2,81	1	1	1	1	1	2	2
8	11,20	2,09	0	0	0	1	1	1	2

Tabelle IX.

Der Verflüssigungsgrad der trypsinverdauten Gelatine.
(0,1 ‰ Trypsin; 45°.)

Nr.	$p_{H^{\cdot}}$	$p_{OH'}$	Verdauungszeit in Minuten					
			60	80	100	120	140	160
1	7,33	5,96	1	4	5	7	8	10
2	7,70	5,59	1	5	6	8	9	11
3	8,62	4,67	2	6	6	9	10	12
4	9,06	4,23	2	6	7	10	11	12
5	9,50	3,79	2	6	6	10	10	12
6	9,88	3,41	1	4	5	7	7	9
7	10,50	2,79	1	1	1	1	1	1
8	11,22	2,07	0	0	1	1	2	3

Tabelle X.

Der Verflüssigungsgrad der trypsinverdauten borsäurefreien Gelatine.
(0,4 ‰ Trypsin; 30°.)

Nr.	$p_{H^{\cdot}}$	$p_{OH'}$	Verdauungszeit in Minuten									
			30	32	34	36	38	40	42	44	46	50
1	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	11,4	2,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	10,7	3,0	0	1	1	4	4	5	5	6	8	9
4	10,2	3,5	1	2	3	5	6	6	7	9	11	12
5	9,8	4,0	2	2	5	6	6	8	8	11	12	12
6	9,3	4,6	1	1	5	6	6	8	8	11	12	12
7	8,1	5,6	0	1	1	2	4	—	—	—	7	9	11
8	6,8	6,9	0	0	0	0	0	—	1	—	2	5	6
9	—	—	0	0	0	0	—	0	—	0	0	0

Tabelle XI.

Der Verflüssigungsgrad der trypsinverdauten, borsäurefreien, teilweise natrongespaltenen Gelatine.
(0,4 ‰ Trypsin; 30°.)

Nr.	$p_{H^{\cdot}}$	$p_{OH'}$	Verdauungszeit in Minuten				
			7	10	12	15	30
1	—	—	—	—	—	1	6
2	—	—	—	—	—	9	12
3	10,2	3,5	3	6	8	12	12
4	9,7	4,0	3	6	9	12	12
5	9,1	4,6	3	7	10	12	12
6	8,3	5,4	1	5	9	12	12
7	—	—	1	2	6	—	—
8	—	—	—	—	—	1	7
9	—	—	—	—	—	0	2

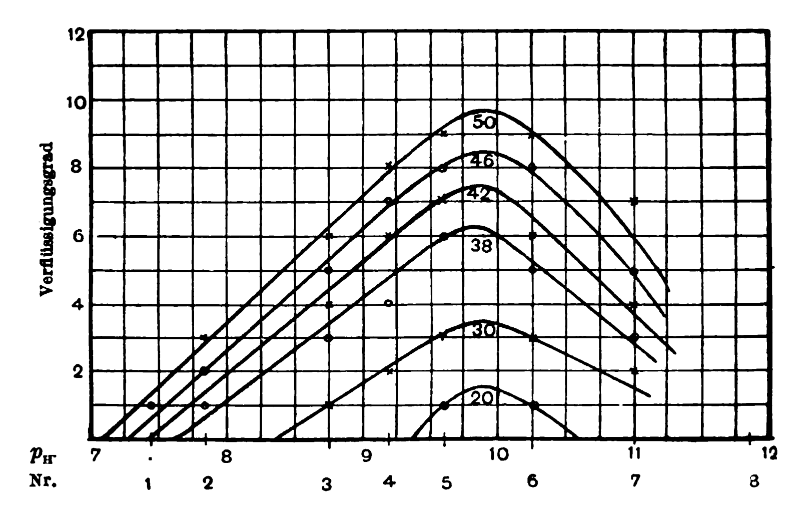


Fig. 1. Der Verflüssigungsgrad der trypsinverdauten Gelatine. 0,4 ‰ Trypsin; 30°. (Verdauungszeit: 20—30—38—42—46—50 Minuten.)

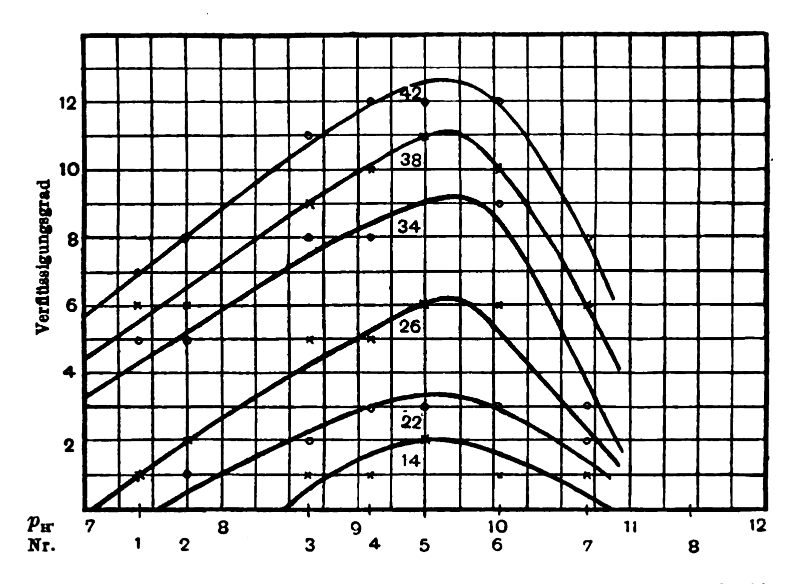


Fig. 2. Der Verflüssigungsgrad der trypsinverdauten Gelatine. 0,4 ‰ Trypsin; 37°. (Verdauungszeit: 14—22—26—34—38—42 Minuten.)

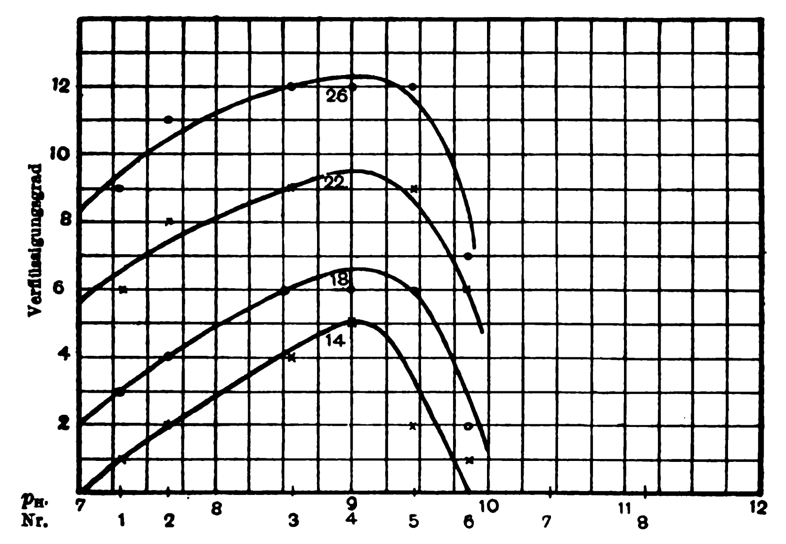


Fig. 3. Der Verflüssigungsgrad der trypsinverdauten Gelatine. 0,4 °/₀₀ Trypsin; 45°. (Verdauungszeit: 14—18—22—26 Minuten.)

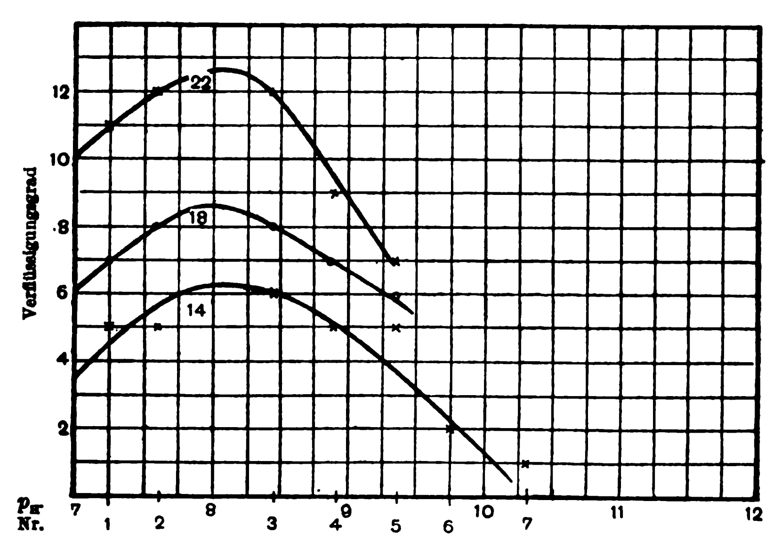


Fig. 4. Der Verflüssigungsgrad der trypsinverdauten Gelatine. 0,4 °/₀₀ Trypsin; 55°. (Verdauungszeit: 14—18—22 Minuten.)

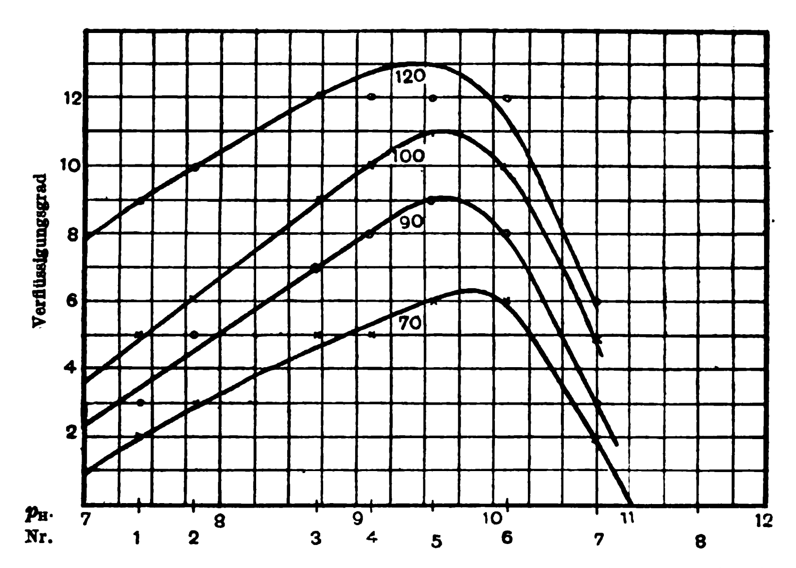


Fig. 5. Der Verflüssigungsgrad der trypsinverdauten Gelatine. 0,2‰ Trypsin; 37°. (Verdauungszeit: 70—90—100—120 Minuten.)

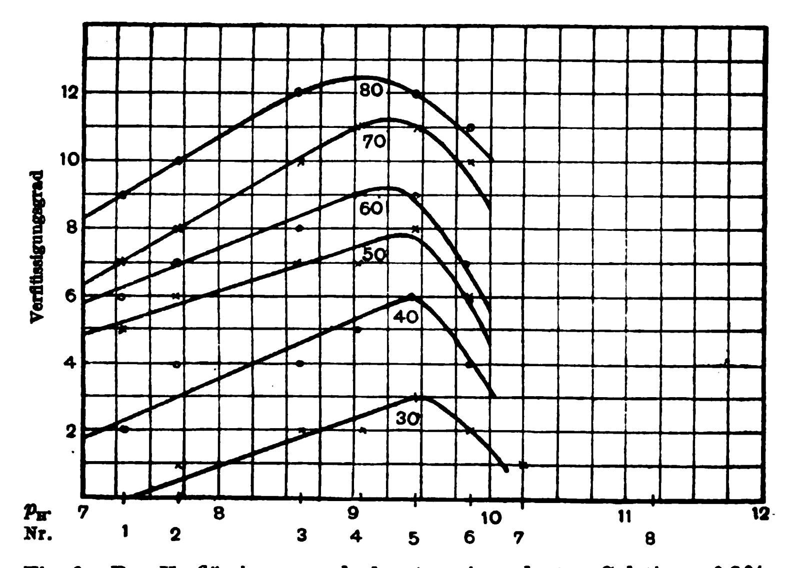


Fig. 6. Der Verflüssigungsgrad der trypsinverdauten Gelatine. 0,2‰ Trypsin; 45°. (Verdauungszeit: 30—40—50—60—70—80 Minuten.)

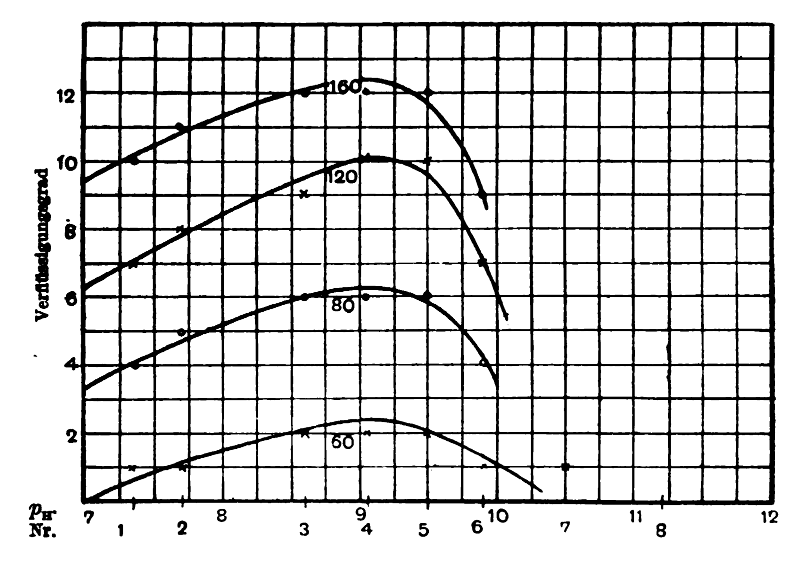


Fig. 7. Der Verflüssigungsgrad der trypsinverdauten Gelatine. 0,1 ‰ Trypsin; 45°. (Verdauungszeit: 60—80—120—160 Minuten.)

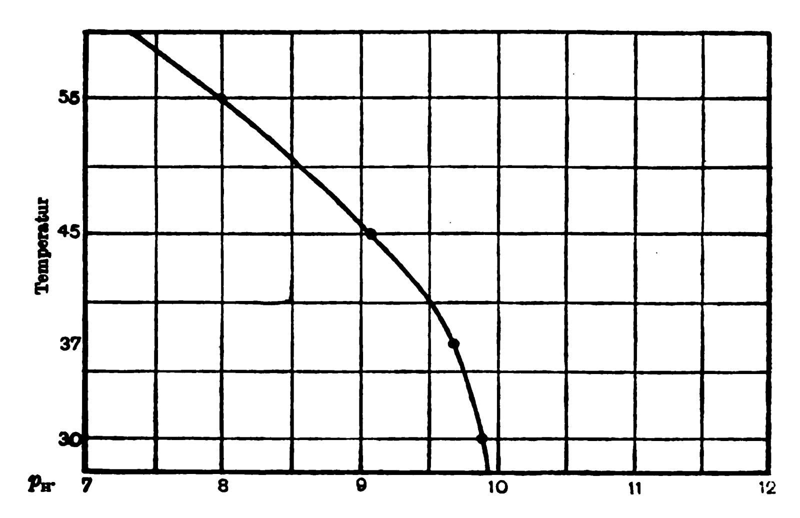


Fig. 8. Die Verschiebung der optimalen Wasserstoffionenkonzentration mit steigender Temperatur.

E. Versuche über die Bedeutung der Hydroxylionen bezüglich der Erstarrungszeit.

Daß es notwendig ist, die Erstarrung bei derselben Wasserstoffionenkonzentration vor sich gehen zu lassen, oder anders gesagt, die Mischung vor der Abkühlung zu neutralisieren, zeigten gleich die einleitenden Versuche. Dies erhellt aus den folgenden zwei Beispielen.

Zu 40 ccm einer 7%igen Gelatine, die 20 Stunden lang bei 37° in 0,04 n-natronhaltiger alkalischer Lösung (1,6 ccm n-Natriumhydroxyd in 40 ccm entsprechend) gestanden hatte, wurden die unten angegebenen Mengen Salzsäure nebst Wasser und Trypsinlösung zugesetzt, so daß das gesamte Volumen 50 ccm betrug. Die übrigen Versuchsdaten sind in der Tabelle XII angegeben.

Tabelle XII.

Der Verflüssigungsgrad der trypsinverdauten borsäurefreien Gelatine (30°), teils ohne Neutralisation (3,2‰ Trypsin), teils mit Neutralisation (0,8‰ Trypsin).

Verdaut in Minuten	Ohne Neutralisation				Mit Neutralisation		
	5	10	15	30	25	35	50
ccm n-Salzsäure							
0,0	6	12	12	12	2	5	9
0,4	0	12	12	12	6	7	12
0,6	0	6	12	12	6	9	12
0,8	0	0	9	12	7	9	12
1,0	0	0	6	12	1	7	12
1,2	0	0	0	12	0	2	6
1,4	0	0	0	0	0	0	0

Wie aus der Tabelle deutlich hervorgeht, spielt die Neutralisation hier bei der Anwendung borsäurefreier Gelatine eine wichtige Rolle.

Wurde die Methode dagegen in der für die Hauptversuche benutzten Ausführung angewandt, dann war die Neutralisation von keinem Belang. Um dies festzustellen, wurden die mit borsäurehaltiger Gelatine hergestellten Mischungen Nr. 1, 5 und 8 bzw in 38, 26 und 46 Minuten bei 37° verdaut, wonach eine Reihe Proben von je 5 ccm entnommen und in 1 ccm Wasser oder 1 ccm Neutralisationsmischung (siehe S. 10) pipettiert wurden. Jede halbe Minute wurde eine Probe ent-

nommen; die erste wurde nach Abkühlung in 5 Minuten, die nächste nach 10 Minuten usw. abgelesen; dieselbe Probe kann nämlich nicht mehr als einmal abgelesen werden. Der Verflüssigungsgrad wurde nach 5—10—15—20 minutiger Abkühlung abgelesen. Es war zwischen den neutralisierten und den nicht neutralisierten Proben kein Unterschied bemerkbar. Da die Bedeutung der Neutralisation in der alkalischsten Mischung am deutlichsten hervortreten mußte, wurde Nr. 8 noch einmal untersucht. Sowohl die neutralisierte als auch die alkalische Probe erstarrten vor der Verdauung in 4,5 Minuten und nach 50 minutiger Verdauung in 10 Minuten.

Daß hier kein Unterschied in der Erstarrungszeit der alkalischen und der neutralen Probe sich nachweisen läßt, rührt von der zugesetzten Borsäure her. Aus einem größeren Versuchsmaterial ging nämlich hervor, daß Gelatine ohne Borsäure erheblich langsamer in alkalischen als in neutralen Mischungen erstarrt, und zwar besonders wenn die Gelatine im voraus in alkalischer Lösung erhitzt (durch Hydroxylionen gespalten) ist, wogegen eine borsäurehaltige Gelatine ebenso schnell in alkalischer wie in neutraler Lösung erstarrt, sowohl wenn die Gelatinelösung frisch hergestellt als auch wenn dieselbe durch Hydroxylionen oder Trypsin beeinflußt ist. Bezüglich einer deutschen Gelatine war die Erstarrungszeit der borsäurehaltigen, teilweise natrongespaltenen Gelatinelösung in alkalischer Lösung sogar kürzer als in neutraler, was doch ziemlich bemerkenswert scheint, da die Erstarrungsfähigkeit bekanntlich schnell abnimmt, wenn die Gelatine in alkalischer Lösung erwärmt wird.

Unter den Versuchen werden hier nur die folgenden zwei Erwähnung finden, weil diese die Verhältnisse, die für die hier benutzte Gelatinemethode von Belang sind, hinreichend beleuchten. Um sicher zu sein, daß die eigentümliche Beziehung der Borsäure zur Erstarrungszeit nicht von einer während der Aufbewahrung stattgefundenen Umwandlung unserer Stammgelatinelösung herrührt, wurden die Versuche sowohl mit einer neu hergestellten Lösung der französischen Gelatine als auch mit einer Lösung einer deutschen Gelatine (Emulsionsgelatine von Stoeß & Co., Heidelberg) wiederholt. Diese Lösungen verhielten sich auf genau dieselbe Weise wie die Stammlösung.

Da es sich darum handelte, zu ermitteln, ob Gelatine, die entweder unbeeinflußt oder teilweise durch Trypsin bzw. Hydroxylionen gespalten war, bei Wasserstoffionenkonzentrationen von 10^{-7} bis 10^{-12}

ungleich schnell erstarrte, genügte es, eine Untersuchung einer stark alkalischen Mischung vorzunehmen, und zwar durch Messung der Erstarrungszeiten (oder vielmehr des Verflüssigungsgrades nach einer passenden Abkühlungszeit) der entnommenen Proben von je 5 ccm, die teils durch 1 ccm verdünnter Salzsäure neutralisiert, teils mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt wurden. Ein Unterschied in der Erstarrungszeit zwischen den neutralen und den mit Wasser verdünnten und daher alkalischen Proben muß nämlich bei den alkalischen Mischungen am deutlichsten hervortreten. Ist ein solcher Unterschied vorhanden, so ist es notwendig, sämtlichen Proben die gleiche Wasserstoffionenkonzentration während der Erstarrung zu geben, damit der Spaltungsgrad der Gelatine der einzige Faktor ist, der die Erstarrungsgeschwindigkeit bedingt.

Die Untersuchung wurde auf ganz dieselbe Weise wie bei den ebengenannten Versuchen ausgeführt, die zeigten, daß die Neutralisation die Erstarrungszeit der borsäurehaltigen Gelatinelösung nicht in meßbarem Grade ändert.

Als Beispiel für die Erstarrungsverhältnisse einer borsäurefreien Gelatine kann eine mit der Stammgelatine ausgeführte Versuchsreihe dienen. Die benutzte Mischung besteht aus 40 ccm 7%iger Gelatine, 9 ccm 0,2 n-Natriumhydroxyd und 1 ccm 2%igen Trypsins; zu 5 ccm hiervon kamen als Neutralisationsmischung 0,8 ccm 0,2 n-Salzsäure und 0,2 ccm Wasser; elektrometrische Messungen zeigten, daß die Wasserstoffionenkonzentration vor ($p_{H^{\cdot}} = 11,3$) und nach der Neutralisation ($p_{H^{\cdot}} = 7,0$) dann ziemlich genau dieselbe wurde wie für die Mischung Nr. 8 der Hauptversuche. Die Verdauung ging bei 37° vor sich.

Abkühlungszeit		2	4	6	8	10	12	15
Vor der Verdauung:								
Verflüssigungsgrad,	alkalisch	12	—	1	—	0	—	—
	neutral	9	—	0	—	0	—	—
Nach 50minutiger Verdauung:								
	alkalisch	12	11	6	3	1	0	—
	neutral	11	2	1	0	0	0	—
Nach 100minutiger Verdauung:								
	alkalisch	—	12	10	8	6	2	1
	neutral	—	7	6	2	1	0	0

Unter den mit der deutschen Gelatine gemachten Versuchen sei hier nur der mit borsäurehaltiger, teilweise natrongespaltener Gelatine angestellte angeführt. 70 g Gelatine, 0,4 g Thymol und 0,2 g/Mol. Borsäure wurden in warmem Wasser gelöst und auf 1000 ccm gebracht. Die zu untersuchende, der Nr. 8 entsprechende Mischung bestand aus 40 ccm der letztgenannten Lösung, 6 ccm 2 n-Natriumhydroxyd und 3 ccm Wasser. Nach 18stündigem Stehenlassen bei 37° im Thermostat wurde 1 ccm 2%iger Trypsinlösung zugesetzt.

Gleich nach Zusatz des Enzyms.

Abkühlungszeit		3	4	5	7	10
Verflüssigungsgrad,	alkalisch	11	10	7	2	0
	neutral	12	11	10	6	1

Nach 40minutiger Verdauung:

Abkühlungszeit	6	9	12	16	20	24	28
Verflüssigungsgrad, alkalisch	11	9	7	3	2	1	0
neutral	12	11	9	6	3	2	1

Die Gelatine erstarrt somit am schnellsten in alkalischer Flüssigkeit; doch ist der Unterschied kein großer.

Diese eigentümliche Wirkung der Borsäure darf mit der durch Borate bewirkten Änderung der Erstarrungsgeschwindigkeit der Gelatine nicht verwechselt werden — ein Verhältnis, das in dieser Abhandlung gar nicht erwähnt wird —, und die Erklärung ist auch nicht in den Eigenschaften der Borsäure als Puffer zu suchen, weil die Lösungen selbstverständlich derart hergestellt wurden, daß die Wasserstoffionenkonzentrationen — elektrometrisch gemessen — in den borsäurehaltigen Lösungen fast dieselben wie in den borsäurefreien waren.

Wie aus diesen Versuchen ersichtlich, sind die bei der Erstarrung der Gelatine sich abspielenden Vorgänge noch so unbekannt und so unübersichtlich, daß eine Unterlassung der Neutralisation keineswegs zu empfehlen ist.

Um zu sehen, ob die S. 6 erörterte Spaltung durch Hydroxylionen irgendeine Bedeutung unter den gewählten Versuchsbedingungen hatte, wurden ferner die folgenden Versuche mit borsäurehaltiger Gelatine und mit Wasser statt des Trypsins angestellt.

Die Mischungen Nr. 5 und Nr. 8 wurden diesbezüglich untersucht, und zwar sowohl gleich nach Herstellung als auch nach 1 bzw. 3stündigem Stehenlassen im Thermostat bei 37°. Der Verflüssigungsgrad nach verschiedenen Abkühlungszeiten wurde ermittelt; vor der Abkühlung wurden die Proben in üblicher Weise neutralisiert.

Nr. 5.

Abkühlungszeit		2	3	4	5
Die Proben wurden entnommen:					
sogleich	Verflüssigungsgrad	9	5	0	0
nach 1 Stunde	„	9	6	0	0
„ 3 Stunden	„	9	6	2	0

Nr. 8.

Abkühlungszeit		2	3	4	5	7	9	11	13	15
Die Proben wurden entnommen:										
sogleich	Verflüssigungsgrad	11	5	0	—	—	—	—	—	—
nach 1 Stunde	„	11	7	1	0	—	—	—	—	—
„ 3 Stunden	„	12	12	11	11	9	5	2	1	0

Da nun die Hauptversuche nicht länger als 50 Minuten dauerten und die Abkühlungszeit 15 Minuten betrug, wird diese

Erscheinung keinen Fehler bei der Bestimmung der Optimalzone verursachen.

Im Anschluß hieran ist jedoch hervorzuheben, daß diese Spaltung durch Hydroxylionen allerdings eine so erhebliche ist, daß dieselbe die Herstellung größerer Mengen der Mischungen von Gelatine und Natriumhydroxyd behufs einer ganzen Untersuchung unmöglich macht, indem sowohl die Aufbewahrung als auch das mehrmals wiederholte Schmelzen, das um die für einen Versuch zu benutzende Menge abzumessen nötig ist, nach und nach die Erstarrungsfähigkeit verringern werden[1]), und zwar in solchem Grade, daß die letzten Versuche wertlos werden. Eine Stammgelatine muß daher in neutraler oder schwach saurer Lösung aufbewahrt werden.

4. Einige Bemerkungen über die Resultate.

Aus den Tabellen und Kurven ist zu ersehen, daß die optimale Wasserstoffionenkonzentration der Gelatineverflüssigung — in 6 %iger Lösung durch 0,4 ‰ Trypsin —

bei 30°	37°	45°	55°
$10^{-9,9}$	$10^{-9,7}$	$10^{-9,1}$	$10^{-8,0}$

beträgt und durch 0,2 ‰ Trypsin

bei 37° $10^{-9,8}$ bis $10^{-9,5}$ beträgt
und bei 45° $10^{-9,5}$ bis $10^{-9,1}$

und durch 0,1 ‰ Trypsin

bei 45° $10^{-9,1}$ beträgt.

Da die Dissoziationskonstante sich mit steigender Temperatur vergrößert (der Exponent ohne Vorzeichen niedriger wird), werden in einer Reihe Lösungen mit den gleichen Hydroxylionenkonzentrationen, aber mit verschiedenen Temperaturen die Wasserstoffionenkonzentrationen verschiedene Werte haben, und zwar werden diese Werte höher bei den hohen als bei den niedrigen Temperaturen sein. Da nun, wie oben erwähnt, die optimale Wasserstoffionenkonzentration mit steigender Temperatur zunimmt, so könnte die optimale Hydroxylionenkonzentration möglicherweise bei allen Temperaturen gleich

[1]) Dieses wurde bereits von Fermi festgestellt. Arch. f. Hygiene 55, 175, 1906.

sein. Eine Betrachtung der Zahlen der Tabellen lehrt jedoch, daß dieses nicht der Fall ist. Die optimale Hydroxylionenkonzentration beträgt für 0,4 $^0/_{00}$ Trypsin und bei

30°	37°	45°	55°
$10^{-3,8}$	$10^{-3,8}$	$10^{-4,2}$	$10^{-5,0}$

Mit steigender Temperatur wird das auf der alkalischen Seite gelegene Optimum somit gegen den Neutralpunkt hin verschoben (vgl. Fig. 8). Diese Erscheinung rührt wahrscheinlich davon her, daß die optimale Wasserstoffionenkonzentration teils von der Dissoziation des Substrats und des Enzyms[1]), teils auch von der Zerstörung des Enzyms abhängig ist, und diese drei Faktoren verändern sich nicht allein mit der Wasserstoffionenkonzentration und der Verdünnung, sondern auch mit der Temperatur.

In dem vorliegenden Falle übt die Zerstörung des Enzyms wahrscheinlich den überwiegenden Einfluß auf die Verschiebung des Optimums aus. Trypsin wird bekanntlich in alkalischer Lösung schnell zerstört, und $10^{-9,9}$ — das Optimum bei 30° — entspricht beinahe der Wasserstoffionenkonzentration einer $^n/_{10\,000}$-Natriumhydroxydlösung. In der Mischung Nr. 8, deren Wasserstoffionenkonzentration bei 30° beinahe einer $^n/_{100}$-Natriumhydroxydlösung entspricht, hat das Enzym in keiner Versuchsreihe, auch nicht nach sehr langer Verdauungsdauer, die Gelatine so weit zu spalten vermocht, daß die Erstarrungszeit länger als 15 Minuten würde. Daß das Enzym nicht ganz und gar zerstört ist, geht aus den Versuchen S. 28 hervor, wo der Verflüssigungsgrad nach kürzerer Abkühlungszeit als 15 Minuten ermittelt ist.

Da die Zerstörung des Enzyms wahrscheinlich bei den höheren Hydroxylionenkonzentrationen am schnellsten vor sich geht, muß das Optimum mit wachsender Versuchsdauer gegen die saure Seite hin verschoben werden; die wirksame Enzymmenge wird nämlich mit der Zeit vermindert, und zwar am schnellsten in den am stärksten alkalischen Lösungen. In den Versuchen mit 0,2 $^0/_{00}$ Trypsin ist eine Andeutung hiervon zu erblicken, aber in den Versuchen mit 0,4 und mit 0,1 $^0/_{00}$

[1]) Oder besser gesagt von der Dissoziation derjenigen Stoffe, die die Träger der Enzymwirkung sind.

Trypsin hält sich das Optimum unverändert bei allen benutzten Versuchzeiten. Die Gelatinemethode ist allerdings nicht als so genau anzusehen, daß man hieraus entscheidende Schlüsse ziehen könnte.

Da die optimale Wasserstoffionenkonzentration mit der Temperatur variiert, muß folglich auch die optimale Temperatur mit der Wasserstoffionenkonzentration variieren, und eine Bestimmung eines Temperaturoptimums besitzt daher nur geringen Wert, wenn nicht gleichzeitig auch die Wasserstoffionenkonzentration gemessen wird.

Aus den Tabellen erhellt dieses sehr deutlich, indem die optimale Temperatur für eine so alkalische Lösung wie Nr. 7 zwischen 37° und 45° gelegen ist, während sie für Nr. 6 ungefähr bei 45° und für Nr. 1 höher als 55° liegt[1]).

Vergleicht man die Zeiten, die nötig sind, um bei der optimalen Wasserstoffionenkonzentration einen bestimmten Verflüssigungsgrad zu erreichen, so ersieht man, daß diese Zeiten bei den Temperaturen 55°, 45°, 37° und 30° sich wie 1 : 1,2 : 1,8 : 2,8 verhalten. Diese Verhältnisse deuten darauf hin, daß bei der optimalen Wasserstoffionenkonzentration die optimale Temperatur bei 55° oder vielleicht ein bißchen höher liegt.

Schon in der Einleitung ist erwähnt, daß Kurt Meyer das Optimum für Casein-Bakterienprotease bei $10^{-7,2}$ und für Casein-Pankreatin bei 10^{-8}, und daß Michaelis und Davidsohn für Pepton-Pankreatin bei 10^{-8} gefunden haben. Für Gelatine-Pankreatin haben unsere Messungen nun die Konzentration $10^{-9,7}$ ergeben, und zwar bei 37°, der Temperatur, bei welcher auch die eben genannten Bestimmungen ausgeführt sind. Daß diese Optima so verschieden sind, erscheint nicht sonderbar, wenn man sich erinnert, daß die Untersuchungen von Ascoli und Neppi[2]) gezeigt haben, daß die Änderung des Säuregrades einer Trypsinlösung von ungleicher Bedeutung bei dem Abbau

[1]) Jedoch ist zu beachten, daß diese Versuche einen anderen Zweck haben als die Bestimmung des Temperaturoptimums.

[2]) Ascoli und Neppi, Zeitschr. f. physiol. Chem. 56, 135, 1908; siehe weiter Pollak, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6, 95, 1905 und Hattori, Arch. int. de Pharm. et de Thérap. 18, 255, 1908, zitiert nach Biochem. Centralbl. 8, 1014, 1909.

verschiedener Proteinstoffe ist. Die erwähnten Forscher haben z. B. nachgewiesen, daß Trypsin, das in lackmusneutraler Lösung Gelatine, Serum und Eiereiweiß fast gleich schnell abbaut, in schwach saurer Lösung („neutral“ auf Methylorange) dagegen allein die Gelatine, aber weder das Serum noch das Eiereiweiß abbauen kann.

Da Michaelis und Davidsohn die Enzymspaltung mittels der Formoltitrierung und wir mittels der Messung einer physikalischen Fähigkeit verfolgen, deren Zusammenhang mit dem chemischen Bau der Gelatine im Dunkeln liegt, so ist es möglich, daß die Bestimmung der optimalen Wasserstoffionenkonzentrationen für zwei voneinander unabhängige Prozesse ausgeführt worden ist. In solchem Falle würde eine Formoltitrierung der verdauten Gelatinemischung ein anderes Optimum geben können als die Beurteilung des Verflüssigungsgrades; die Formoltitrierung kann aber, wie im Abschnitt 3 C (S. 16) näher erörtert ist, in diesem Falle nicht benutzt werden.

Schließlich ist die Aufmerksamkeit nur noch auf die interessante Erscheinung zu lenken, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Verdauung bei zunehmender Enzymkonzentration sich als größer erweist als die Geschwindigkeit, die in der Voraussetzung, daß Verdauungsgeschwindigkeit und Enzymkonzentration proportional verliefen, zu erwarten wäre; dieses geht aus einem Vergleich der Tabellen V, VIII und IX, die sämtlich für 45° gelten, sowie der Tabellen IV und VII für 37°, deutlich hervor. Für die Enzymkonzentrationen 0,4 °/₀₀, 0,2 °/₀₀ und 0,1 °/₀₀ verhalten sich nämlich die Zeiten wie 1 : 3 : 6. Übereinstimmend hiermit betrugen auch die Zeiten bei einer Versuchsreihe mit 0,8 °/₀₀ Enzym nur ein Drittel und nicht die Hälfte der für 0,4 °/₀₀ Trypsin festgestellten Zeiten.

Die meisten Forscher, welche die Abhängigkeit der Enzymwirkung von der Enzymkonzentration untersuchten, haben freilich eine ausgesprochene Proportionalität konstatiert, weil sie verhältnismäßig schwache Lösungen von Substrat und von Enzym benutzten; dagegen hat Grützner[1]) gefunden, daß die

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. **141**, 63, 1911.

Wirkung des Ptyalins und des Pepsins in starken Lösungen von Substrat und Enzym erheblich langsamer als der Konzentration des Enzyms proportional steigt, während das Trypsin merkwürdigerweise sich ganz anders verhält, indem die Wirkung dieses Enzyms auf verhältnismäßig starke Lösungen von Casein sehr schnell mit der Konzentration steigt. Unsere Versuchsresultate stehen somit in bester Übereinstimmung mit den Befunden Grützners.

Zusammenfassung.

Um Fermis Gelatinemethode zur Untersuchung der tryptischen Wirkung bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen benutzen zu können, wurde die Methode in zwei Punkten geändert: erstens wurde der Gelatine Borsäure zugesetzt, um eine Änderung der Wasserstoffionenkonzentration während der Verdauung zu vermeiden, und zweitens wurde die Gelatinemischung nach der Verdauung neutralisiert, damit die Erstarrung in sämtlichen Proben bei der gleichen Wasserstoffionenkonzentration vor sich gehen könnte.

Die Methode wurde demnach folgenderweise ausgeführt:

Borsäurehaltige Gelatinelösungen mit bekannter Wasserstoffionenkonzentration wurden auf die gewünschte Temperatur erwärmt, das Enzym zugesetzt, und nach Verlauf einer passenden Zeit wurden dann 5 ccm jeder Lösung entnommen und in Reagensgläser abpipettiert, die im voraus abgekühlt waren und 1 ccm einer solchen Salzsäurelösung, welche die 5 ccm Gelatinemischung neutralisieren konnte, enthielten. Nach Stehenlassen im Eiswasser während 15 Minuten wurden die Gläser herausgenommen und der Verflüssigungsgrad beurteilt.

Mittels dieser Methode wurde festgestellt, daß die optimale Wasserstoffionenkonzentration der Gelatineverflüssigung bei

30°	37°	45°	55°
$10^{-9,9}$	$10^{-9,7}$	$10^{-9,1}$	$10^{-8,0}$

betrug (für eine 6%ige Gelatinelösung und eine 0,4‰ige Trypsinlösung).

Mit steigender Temperatur wird somit das auf der alkalischen Seite gelegene Optimum gegen den Neutralpunkt hin verschoben.

Aus den Versuchen erhellt auch, daß die Verdauungsgeschwindigkeit bei der angewandten verhältnismäßig hohen Konzentration des Substrates erheblich schneller als proportional der Enzymkonzentration steigt — in bester Übereinstimmung mit den von Grützner ausgeführten Messungen der tryptischen Spaltung des Caseins.

Aus einigen Versuchen, die zur Erläuterung der Wichtigkeit der Neutralisation angestellt wurden, ergab sich, daß borsäurefreie Gelatine schneller in neutraler als in alkalischer Lösung erstarrt, wogegen borsäurehaltige Gelatinelösungen mit der gleichen Geschwindigkeit erstarren, ob sie alkalisch oder neutral sind. Bei einer deutschen Gelatine war die Erstarrungszeit der borsäurehaltigen, teilweise natrongespaltenen Gelatinelösung sogar kürzer in alkalischer als in neutraler Lösung.

Die vorliegenden Untersuchungen sind im Carlsberg Laboratorium auf Anregung des Herrn Professor S. P. L. Sörensen ausgeführt, dem wir für die wertvollen Ratschläge und die tatkräftige Unterstützung, die er uns stets aufs freundlichste und zuvorkommendste gewährt hat, zu ergebenstem Dank verpflichtet sind.

Über das Wesen der sogenannten Klausnerschen Serumreaktion.

Von

E. Klausner.

(Aus dem k. k. Pharmakologischen Institut und der k. k. Deutschen dermatologischen Universitätsklinik in Prag.)

(Eingegangen am 24. Oktober 1912.)

I.

In Nr. 7 und 11 der Wiener klin. Wochenschr. 1908 habe ich[1]) seinerzeit über eine neue, einfache, serodiagnostische Methode für Syphilis berichtet.

Es schien anfangs, daß der Zusatz einer bestimmten Menge destillierten Wassers zu frisch gewonnenem Serum innerhalb eines Zeitraumes von längstens 12 Stunden einen deutlichen flockigen Niederschlag nur in Luetikerserum bedinge, während das nichtsyphilitische Serum innerhalb dieser Zeit keinen oder einen nur ganz geringen Niederschlag ergäbe. Ich überzeugte mich aber bald selbst, daß gewisse andere Erkrankungen sowohl Infektionskrankheiten als auch, wenn auch seltener, manche Hautkrankheiten das gleiche Präcipitationsphänomen mit destilliertem Wasser zeigen, und habe diese Beobachtungen gleich in den ersten Veröffentlichungen mitgeteilt. An der Tatsache jedoch, daß die erwähnte Reaktion für die Syphilis sehr charakteristisch ist und besonders in gewissen Stadien —

[1]) Klausner, Vorläufige Mitteilung über eine Methode der Serumdiagnostik bei Lues. Wiener klin. Wochenschr. **1908**, Nr. 7. — Über eine Methode der Serumdiagnostik bei Lues. Wiener klin. Wochenschr. **1908**, Nr. 11. — Ergebnisse mit der von mir angegebenen Präcipitationsreaktion bei Syphilis. Prager med. Wochenschr. **33**, Nr. 46. — Klinische Erfahrungen über das Präcipitationsphänomen mit destilliertem Wasser im Serum Syphilitischer. Wiener klin. Wochenschr. **1908**, Nr. 26. — Die Lipoide im Serum bei Lues. Wiener klin. Wochenschr. **1912**, Nr. 21.

es sind dies die Zeit kurz vor Ausbruch des ersten Exanthems und die Stadien frischer unbehandelter Sekundärlues — das Ausflockungsphänomen in besonderer Intensität und ausnahmslos vorhanden ist, mußte ich nach wie vor festhalten, und es fallen die Differenzen gewisser Autoren in dieser Beziehung ihrer Arbeitstechnik zur Last, die in ein oder der anderen Richtung von der meinerseits genau angegebenen Technik abwich.

Die Resultate der verschiedenen Autoren seien daher, soweit sie mir bekannt sind, kurz wiedergegeben.

Nobl und Arzt[1]) fanden die Reaktion bei 55 % ihrer untersuchten Fälle von Lues positiv, und ungefähr über die gleiche Prozentzahl 54 berichteten in ihrer Nachuntersuchung Fritz und Kren[2]). Demgegenüber stehen die Resultate Kappelhofs[3]), der bei der Zahl von 104 untersuchten Fällen in keinem Falle von florider Sekundärlues die Reaktion negativ fand. Dieser Autor konnte gleichfalls die von mir betonte Tatsache bestätigen, daß bei florider, unbehandelter Lues die Ausflockung in kurzer Zeit, in 2 bis 5 Stunden erfolge. Behring[4]), der an 95 Fällen die Reaktion nachgeprüft hat, fand sie in etwa 71 % der Fälle bei sekundärer Lues positiv, und Hayn[5]), der 54 Fälle frischer Lues (Sklerosen und Sekundärlues) mit manifesten Erscheinungen auf den Ausfall der Fällungsreaktion untersucht hat, bestätigte meine Angaben insoweit, als er in ungefähr 91 %, das sind 49 seiner Fälle, einen positiven Ausfall der Reaktion fand. Diese Resultate Hayns decken sich in bezug auf die Häufigkeit des Befundes einer positiven Reaktion bei Sklerosen und florider Sekundärlues mit den Befunden Kohns[6]), der gleichfalls in fast allen Fällen dieses

---

[1]) Nobl und Arzt, Zur Seradiagnostik der Syphilis. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 9.

[2]) Fritz und Kren, Über den Wert der Serumreaktion bei Syphilis nach Porges-Meier und Klausner. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 12.

[3]) Kappelhof, Über die Klausnersche Reaktion bei Syphilis. Tidschrift f. Genesk. 1908, Nr. 21.

[4]) Behring, Praktische Bedeutung der Serumdiagnostik bei Lues. Münch. med. Wochenschr. 1908, Nr. 49.

[5]) Hayn, Die Klausnersche Reaktion und ihre klinische Verwertbarkeit für die Diagnose der Lues. Inaugural-Dissertation, Breslau 1909.

[6]) Kohn, Über die Klausnersche Serumreaktion. Wiener klin. Wochenschr. 1909, Nr. 18.

Stadiums einen positiven Ausfall der Präcipitationsreaktion erzielte. Pasini[1]) erhielt bei 68 Fällen florider Lues, also in 70% der Fälle, eine positive Flockungsreaktion und nähert sich mit dieser Prozentzahl den Befunden Behrings, der, wie oben erwähnt, 71% positiver Reaktionen verzeichnen konnte. Ohne nähere Angabe der untersuchten Fälle haben endlich Müller, Citron[2]), Wassermann[3]) u. a. das Vorhandensein des von mir zuerst beobachteten Präcipitationsphänomens bestätigt. Die beiläufige Bemerkung von Detre und Brozowsky[4]), daß es sich bei der geschilderten Reaktion um ein ganz unregelmäßiges Phänomen ohne planmäßige Gesetzmäßigkeit handle, steht demnach in Widerspruch mit allen bisher mitgeteilten Erfahrungen über die Reaktion. Allerdings differieren die Angaben der zitierten Autoren über die Häufigkeit der Reaktion, eine Erscheinung, die meiner Ansicht nach ihre Erklärung darin findet, daß in einem Teile der Fälle nicht immer frische, d. h. nur wenige Stunden alte Sera zur Reaktion verwendet wurden, daß unter den untersuchten Seren Sera behandelter Luetiker sich befanden, vielleicht auch die Reaktion manchmal im Thermostaten angestellt wurde.

Wenn nun heute in Anbetracht der hohen klinischen Spezifizität der Wassermannschen Reaktion der von mir angegebenen Fällungsreaktion bei Lues mit Recht keine praktische Bedeutung zugemessen wird, so handelt es sich doch bei dem Phänomen um eine ganz regelmäßige Eigenschaft des Serums in gewissen Stadien der Syphilis, die nach meinen ausgedehnten auf mehr als tausend Fälle sich erstreckenden Untersuchungen fast ausnahmslos im Stadium der Sklerose, kurz vor Ausbruch des ersten Exanthems und im Stadium florider Sekundär-Lues, hier wiederum in den Fällen ausgebreiteter

---

[1]) Pasini, Ricerche comperative fra i diversi metodi di sero-diagnosi proposti per la sifilide. L'ospedale maggiore **1909**, Nr. 5.

[2]) Citron, Sitzungsbericht der Königl. Gesellschaft der Ärzte in Berlin. Ref. Berl. klin. Wochenschr. **1908**.

[3]) Wassermann, Über die Serodiagnostik der Syphilis und ihre praktische Bedeutung für die Medizin. Wiener klin. Wochenschr. **1908**, Nr. 21.

[4]) Detre und v. Brozowsky, Die Serumreaktionen der Syphilis. Wiener klin. Wochenschr. **1908**, Nr. 49.

Exantheme, also stets zur Zeit einer Aussaat syphilitischen Virus' in die Blutbahn, auftritt.

Obgleich, wie schon oben erwähnt, infolge der zu geringen Spezifizität der Reaktion auch die Bedeutung der positiven Resultate bei der Lues sehr abgeschwächt wurde und infolgedessen die Anwendung der beschriebenen Reaktion als klinisches Hilfsmittel zur Syphilisdiagnose fallen gelassen werden mußte, so wurde doch die Tatsache des Vorhandenseins des Flockungsphänomens im Serum Syphilitischer von allen Autoren, die sich mit der Nachprüfung meiner Reaktion befaßten, zugegeben. Und es mußte deshalb unser Bestreben sein, festzustellen, was die Ursache des Eintretens einer Ausflockung im Luetikerserum nach Zusatz einer bestimmten, empirisch gefundenen, optimalen Menge destillierten Wassers (auf 0,2 frischen Serums — 0,6 destill. Wasser) sein konnte.

Kreibich[1]), welcher sich von Anfang an intensiv mit dem Wesen der Reaktion beschäftigt hatte, vermutete in Anbetracht dessen, daß der Niederschlag mit destilliertem Wasser auftrat und in physiologischer Kochsalzlösung sich wieder löste, also sich wie Globulin verhielt, daß es sich um eine Globulinvermehrung, wie sie Moll[2]) studiert hat, handle. Diese Annahme Kreibichs erschien um so wahrscheinlicher, als gerade die Infektionskrankheiten wie Typhus, Pneumonie, Tuberkulose, Rhinosklerom das Auftreten der Präcipitationsreaktion in gleicher Intensität wie die Lues aufwiesen. Kreibich jedoch fand bei seinen Untersuchungen die Euglobulinwerte im Serum Syphilitischer nicht höher als bei normalen Individuen. Auch das Gesamtglobulin zeigte keinerlei Veränderungen im Vergleich zu Normalseren.

Wenn also nach diesen Resultaten von einer Globulinvermehrung keine Rede sein konnte, so sprach weiteres gegen den Zusammenhang der Reaktion mit der Antikörperbildung die Tatsache, daß z. B. Typhus abdominalis auf der Höhe des Fiebers die Flockungsreaktion mit destilliertem Wasser gab, während sie im Serum des entfieberten Patienten negativ ausfiel. Da das Präcipitat, nach mehrfacher Waschung in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, bei 28 % Ammonsulfatsättigung wieder vollständig ausfiel, war festgestellt, daß der ausfallende Eiweißkörper mit Fibrinoglobulin identisch ist. Kreibich nahm daher an,

[1]) Kreibich, Verhandlungen der Deutschen dermatol. Gesellschaft. X. Kongreß 1908. — Über die Hydroxylionenkonzentration des pathologischen Blutes. Wiener klin. Wochenschr. **1910**, Nr. 10. — Weiterer Beitrag zur Hydroxylionenkonzentration des pathologischen Blutes. Wiener klin. Wochenschr. **1911**, Nr. 41.

[2]) Moll, Über künstliche Umwandlung von Albumin in Globulin. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **4**.

„daß es sich bei dem Präcipitat um Fibrinogenreste und Fibrinoglobulin handelt, welches im Luetikerserum in größerer Menge oder leichter ausfällbarer Form vorhanden ist als im Serum Normaler".

Noguchi[1]), der sich ebenfalls mit Eiweißuntersuchungen im Serum Syphilitischer befaßt hat, fand eine Globulinvermehrung von solcher Regelmäßigkeit, daß er zum Schluß gelangte, die Globulinvermehrung im Blute Syphilitischer sei beweisender für die Luesdiagnose als die Wassermannsche Reaktion. Zu ähnlichen Resultaten in bezug auf die Eiweißvermehrung im Luetikerserum gelangte Winternitz[2]), der mittels Wägung jene Eiweißfraktion, die bei 28,5 % Ammonsulfatsättigung aus dem Blutplasma erhalten wird, vermehrt fand. Winternitz hat dann ferner mittels des Pulfrichschen Eintauchrefraktometers Bestimmungen vorgenommen und seine Ergebnisse nach dieser Methode dahin präzisiert, „daß der Eiweißgehalt des Blutes (Serum und Plasma) bereits im 2. Inkubationsstadium eine leichte Steigerung aufweise". Diese Vermehrung betrifft in diesem Stadium schon, wenn auch nur geringgradig, das Fibrinogen. Auf der Höhe der floriden Sekundärlues kann die Vermehrung des Gesamteiweiß im Serum 10%, im Plasma 15%, die Vermehrung des Fibrinogens 25% der Normalmengen der betreffenden Stoffe betragen. Bei den Untersuchungen in den Latenzstadien der Sekundärlues und auch bei bestehender Lues gummosa waren die Befunde vermehrten Eiweißes inkonstant. Bei vergleichenden Untersuchungen über den vermehrten Eiweißgehalt und den Ausfall der Wassermannschen und der von mir angegebenen Präcipitationsreaktion ließ sich keine absolute Kongruenz zwischen Eiweißmengen und Ausfall der beiden Seroreaktionen feststellen. Winternitz schließt aus dem zeitlichen Zusammenfallen der Eiweißvermehrung mit der beginnenden Durchseuchung, ihrem Höhepunkt im Stadium florider Sekundärlues und ihrem Abklingen im Latenzstadium auf einen Zusammenhang mit Reaktions- oder Immunitätskörpern. In diesem Sinne hält Winternitz diese Eiweißvermehrung für den quantitativen Ausdruck einer Antikörperbildung bei der Syphilis, und ist der Meinung, daß die Komplementbindungsreaktion und schließlich auch die Präcipitationsreaktion mit destilliertem Wasser als ein qualitativer Ausdruck dieser Antikörperbildung anzusehen ist.

Diesen Untersuchungen schließen sich ferner die Befunde Müllers und Houghs[3]) an, welche mit einer von den Autoren ausgearbeiteten Meßmethode nach dem Prinzip der Nonneschen Probe Eiweißbestimmungen

[1]) Noguchi, Journ. of Americ. Assoc. **1909**; ref. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 35.

[2]) Winternitz, Ein Beitrag zur chem. Untersuchung des Blutes recent luetischer Menschen. Arch. f. Derm. u. Syphilis **93**, 65. Zweiter Beitrag zur chem. Untersuchung des Blutes recent luetischer Menschen. Arch. f. Derm. u. Syphilis **101**, 227.

[3]) Müller und Hough, Vergleichende Globulinmessungen an luetischen Seris. Wiener klin. Wochenschr. **1911**, 167.

in Luetikerseren vornahmen und eine Vermehrung des Gesamtglobulins auf durchschnittlich 94 gegenüber 84,7 bei normalen Seren fanden, während die Vermehrung des Euglobulins bei Lues gegenüber den nicht luetischen Fällen 42,5 : 28,8 Teile betrug. Danach beruht die Vermehrung des Globulins in den Seren von Luetikern auf ihrem höheren Euglobulingehalt. Auch Müller und Hough fanden so wie Winternitz Differenzen zwischen dieser Euglobulinvermehrung und dem Ausfall der Wassermannschen Reaktion und betonen daher, daß die Bestimmung der Euglobuline diagnostisch nicht verwertbar ist.

Diesen oben angeführten Untersuchungen der verschiedenen Autoren stehen die Untersuchungsresultate Spieglers entgegen, der verschiedene Luetikersera nach Hammarsten auf ihren Globulingehalt untersucht hat. Bei der größten Zahl der Fälle fand er das Globulin gegenüber dem Albumin enorm vermindert, daneben wieder normale und erhöhte Werte des Globulins, so daß nach seiner Ansicht aus diesen sprunghaften Werten keine strikten Schlüsse gezogen werden können und nur daraus die Tatsache ersichtlich ist, daß die Syphilis einen bedeutenden Einfluß auf die Blutzusammensetzung ausübt. Außer der Annahme, daß ein vermehrter Globulingehalt im Syphilitikerserum die Ursache des leichteren Ausfalls dieser Eiweißkörper nach Zusatz von destilliertem Wasser sein sollte, mußte man natürlicherweise daran denken, ob nicht ein verringerter Alkalescenzgehalt des Blutes, bzw. eine Vergrößerung der H-Ionenkonzentration desselben die leichtere Ausfällbarkeit der Globuline im Luesserum bedinge. Elias, Neubauer, Porges und Salomon[1]) haben auf Grund dieser Vermutungen Alkalescenzbestimmungen nach Kraus vorgenommen und auch das Säurebindungsvermögen luetischer Sera nach der Methode von Spiro und Pemsel geprüft, konnten aber eine deutliche Herabsetzung der titrierbaren Alkalescenz im Serum Syphilitischer nicht feststellen. Kreibich hat dann in seinen Arbeiten über die Hydroxylionenkonzentration des pathologischen Blutes auch die Lues in den Bereich seiner Untersuchungen gezogen. Er kam zu dem Resultat, daß die bei meiner Reaktion eintretende Globulinausfällung nicht durch die Reaktion des Blutes bedingt sei, denn sie fand sich bei Luetikern mit niedrigen und hohen Zahlen und wird auch nicht durch erhöhte Alkalisierung des Blutes (Sodadarreichung) zum Schwinden gebracht.

Daß die von den verschiedenen Autoren gefundene Globulinvermehrung im Serum bei Lues die Ausflockung dieser Eiweißkörper nach Zusatz von destilliertem Wasser bedinge, schien mir aus folgenden Gründen nicht sehr wahrscheinlich. Ich hatte nämlich feststellen können, daß in Seren, die 1 bis 2 Tage alt waren, auch wenn sie im Eisschrank aufbewahrt

[1]) Elias, Neubauer, Porges, Salomon, Theoretisches über die Serumreaktion auf Syphilis. Wiener klin. Wochenschr. 1908, 748.

wurden, die Reaktion, die im frischen Serum sehr intensiv war, kaum oder gar nicht mehr auftrat. Die gleichen Veränderungen erzielte ich, wenn ich das betreffende Serum $^1/_2$ Stunde auf 56° erhitzte. Ja, es genügte schon die Thermostatentemperatur, um den Ausfall der Reaktion ganz deutlich zu verzögern und abzuschwächen. Moll hingegen konnte nachweisen, daß nach Erhitzen des Serums auf 56° in demselben eine deutliche Globulinvermehrung auftrat. Es war deshalb äußerst auffallend, daß im Luetikerserum, wo nach den Untersuchungen zahlreicher Autoren das Globulin vermehrt war, nach $^1/_2$stündigem Erhitzen auf 56° die Reaktion ausblieb. Ich war deshalb berechtigt anzunehmen, daß der vermehrte Globulingehalt luetischer Sera wenigstens als alleinige Ursache bei der Präcipitationsreaktion nicht in Betracht kommt.

Deshalb wurden im pharmakologischen Institut auf Veranlassung und unter Leitung Prof. Wiechowskis Untersuchungen in der Richtung angestellt, daß ich den Einfluß gewisser Lipoidsubstanzen auf den Ausfall der Präcipitationsreaktion studierte.

Porges, Elias, Neubauer und Salomon hatten in der oben zitierten Arbeit die Vermutung geäußert, daß die von mir angegebene Präcipitationsreaktion mit destilliertem Wasser vielleicht dadurch bedingt sei, daß die mit den Lipoiden reagierenden Eiweißkörper der Luessera sich in einem labileren und leichter fällbaren Zustande befinden, und daß diese Stabilitätsveränderung vielleicht die leichtere Ausfällbarkeit der Eiweißkörper mit destilliertem Wasser bedinge. Ferner hatten Handovsky und Wagner[1]) nachgewiesen, daß im Rinderserum von Lecithin und ebenso von den Serumlipoiden nicht das Albumin, sondern nur die Globuline gefällt werden und knüpfen daran die Bemerkung, daß die von mir gemachten Beobachtungen am Luesserum in einem Zusammenhange mit den von ihnen gefundenen Tatsachen stehen und weisen zugleich auf einen weiteren Zusammenhang mit der Porgesschen Luesreaktion mit Lecithin. Erwähnen will ich ferner die

[1]) Handovsky und Wagner, Über einige physikalisch-chemische Eigenschaften von Lecithinemulsionen und Lecithineiweißmischungen. Diese Zeitschr. **31**, 32.

Arbeiten von Peritz, Lesser, Bergel, Popoff, Bittdorf und Schidovsky, die bis auf die Arbeit von Peritz[1]) erst nach Beendigung meiner Untersuchungen erschienen sind, die ich jedoch in den Bereich meiner Erörterungen ziehe, weil sich dieselben mit den Beziehungen der Lipoide zum syphilitischen Blutserum befassen.

So hat Peritz eine deutliche Erhöhung des Lecithinspiegels bei florider Lues beobachtet. Diesen Befunden entgegen bemerkt jedoch Lesser[2]), daß der Lipoidgehalt des Serums schon bei Normalen beträchtlichen Schwankungen unterworfen ist. Bei den Syphilitikern finden sich keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich des Phosphatidgehaltes gegenüber der Norm. Ein Einfluß der Quecksilberbehandlung auf den Lipoidgehalt des Serums vor und nach der Behandlung ließ sich nicht feststellen.

Bergel[3]), der sich mit experimentellen Studien über das Wesen der Wassermannschen Reaktion befaßt hat, betont die Anwesenheit lipoider Substanzen im Blutserum bei Lues und ihre Bedeutung für das Phänomen der Komplementbindung. Vor kurzem hat Popoff[4]) über hämolysehemmende Erscheinungen luetischer Sera berichtet und kommt zu dem Schlusse, daß infolge der Infektion bei Lues eine Abspaltung von Lipoiden oder lipoidähnlichen Stoffen statthat, die ins Blut übergehen. Die Menge der abgespaltenen Lipoide sei im akuten Stadium der Syphilis größer als in den älteren Perioden der Lues. In diesen letzteren und nach vorausgegangener antiluetischer Behandlung nimmt auch die Menge der Lipoide im Serum ab. Bittdorf und Schidovsky[5]) endlich konnten durch

---

[1]) Peritz, Lues, Tabes und Paralyse in ihrem Verhältnis zum Lecithin. Berl. klin. Wochenschr. **1908**, 53; Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap. **5**, Nr. 3.

[2]) F. Lesser, Syphilis und Lecithin. Arch. f. Derm. u. Syphilis **113**, 609.

[3]) Bergel, Experimentelle Beiträge zum Wesen der Wassermann-Neisser-Bruckschen Reaktion. Münch. med. Wochenschr. **1912**, 1095.

[4]) Popoff, Über hämolysehemmende Erscheinungen bei luetischen Seren und über die Möglichkeit ihrer Ausnützung für die Serodiagnostik bei Syphilis. Deutsche med. Wochenschr. **1912**, 1833.

[5]) Bittdorf und Schidovsky, Experimentelle Untersuchungen über das Wesen der Wassermannschen Reaktion. Berl. klin. Wochenschr. **1912**, Nr. 42.

Zerstörung lipoidreicher Organe eine Hemmung der Hämolyse durch das Serum so behandelter Tiere erzielen. Diese Versuche rufen uns die schon vor Jahren geäußerte Anschauung von Weil und Braun[1]) ins Gedächtnis, die dem Zerfalle von Organzellen eine große Bedeutung beim Zustandekommen der Serumreaktionen bei Lues zuschreiben.

II.

Zu den folgenden Versuchen wurden frisch dargestellte Lipoide verwendet, die wir aus Schweinsgehirnen nach der Methode von Erlandsen[2]), jedoch in der Kälte, gewonnen haben. Es wurden zu diesem Zwecke frische Schweinsgehirne im Trockenapparate nach Wiechowski kalt getrocknet und in der Kälte mit Äther extrahiert. Der klare Extrakt wurde mit Aceton gefällt, der Niederschlag durch Zentrifugieren gewonnen, in Äther gelöst und vom ungelösten abzentrifugiert. Die klare Ätherlösung wurde wieder mit Aceton gefällt, wie vorher behandelt und dieses Vorgehen so oft wiederholt, bis die Acetonfällung in Äther klar löslich war. Hierauf wurde noch einmal gefällt, zentrifugiert, abgegossen und der Niederschlag im Zentrifugierglas unter Kohlensäureatmosphäre im Vakuumexsiccator getrocknet und aufbewahrt. Diese Fraktion enthält Cuorin, Kephalin und Lecithin. Die Acetonlösung wurde im Trockenapparat in der Kälte eingedampft, der Rückstand enthielt die Neutralfette und das Cholesterin.

Das Cuorin-Kephalin-Lecithin-Gemisch wurde in Äther gelöst und mit Alkohol gefällt, zentrifugiert, und dieser Vorgang so oft wiederholt, bis klare Lösung in Äther erfolgte. Die alkoholische Lösung enthält das Lecithin, der Alkohol wurde durch Wegblasen entfernt. Die in Alkohol unlösliche Fraktion wurde in der oben geschilderten Weise im Vakuum getrocknet und aufgehoben. Das Gehirn wurde nach der Ätherextraktion noch weiter mit Äther im Extraktionsapparat erschöpft, der Rückstand in der Kälte mit Alkohol ausgezogen. In diesem Extrakt sind die Cerebroside enthalten. Der Gehirnrückstand

---

[1]) Weil und Braun, Über die Rolle der Lipoide bei der Reaktion auf Syphilis. Wiener klin. Wochenschr. **1908**, 151.

[2]) Erlandsen, Undersögelser over Hjertets fosfatider. Kjobenhavn 1906. Zeitschr. f. physiol. Chem. **51**, 71, 1907.

wurde schließlich mit heißem Alkohol extrahiert, heiß filtriert. Beim Abkühlen fällt das Protagon aus.

Da ich bei meinen Versuchen wässerige Lösungen benutzte, so kamen die Neutralfette, das Cholesterin und die Cerebroside nicht in Betracht, während das Kephalin-Cuorin-Gemisch, das Lecithin und das Protagon sich zu den in folgendem geschilderten Versuchen gut verwendbar zeigten. Ich verwendete stets eine 1%ige wässerige Lösung von Kephalin-Cuorin (L), die stets frisch bereitet wurde und sich als die optimalste Lipoidlösung bei meinen Versuchen erwiesen hat. Das Kephalin-Cuorin in Substanz hielt sich in der oben beschriebenen Weise im Dunkeln aufbewahrt unverändert wirksam, doch wurde fast wöchentlich frisches Lipoid aus frischem Material hergestellt.

Versuch 1.

S = Luesserum.

	Nach				
	2^h	4^h	6^h	8^h	16^h
0,2 S + 0,6 H_2O	–	–	+	+	+++
0,2 S + 0,5 H_2O	–	–	+	+	++
0,2 S + 0,4 H_2O	–	–	–	–	++
0,2 S + 0,3 H_2O	–	–	–	–	+
0,2 S + 0,2 H_2O	–	–	–	–	–

+ Flockung, ++ schwacher Niederschlag, +++ starker Niederschlag.

Wie aus diesem Vorversuche ersichtlich ist, zeigt auch diese Tabelle wieder das Maximum des Fällungsphänomens bei einer Verdünnung des Serums mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:3, d. i. 0,2 S:0,6 H_2O. Eine weitere Verdünnung ist unzulässig, weil dann auch Normal-Sera auszuflocken beginnen.

Versuch 2.

S = Serum von Lues.

	Nach				
	2^h	4^h	6^h	8^h	
0,2 S + 0,6 H_2O	–	+	++	+++	bei Zimmertemperatur
0,2 S + 0,6 H_2O	–	–	–	++	bei 37° im Thermostaten

Die Präcipitationsreaktion muß bei Zimmertemperatur angestellt werden, die Wärme (Thermostatentemperatur) verlangsamt den Eintritt der Fällung.

Versuch 3.

S = Serum von Ekzem.
L_1 = 1 %ige wässerige Lösung von Kephalin-Cuorin.
L_2 = ½ %ige " " " "
L_3 = $^1/_{10}$ %ige " " " "

$0{,}4\ S + 0{,}02\ L_1 = A_1$	$0{,}4\ S + 0{,}02\ L_2 = B_1$	$0{,}4\ S + 0{,}02\ L_3 = C_1$
$0{,}4\ S + 0{,}04\ L_1 = A_2$	$0{,}4\ S + 0{,}04\ L_2 = B_2$	$0{,}4\ S + 0{,}04\ L_3 = C_2$
$0{,}4\ S + 0{,}06\ L_1 = A_3$	$0{,}4\ S + 0{,}06\ L_2 = B_3$	$0{,}4\ S + 0{,}06\ L_3 = C_3$

	Nach	
	5^h	15^h
$0{,}2\ S + 0{,}6\ H_2O$	—	—
A_1	—	—
$0{,}21\ A_1 + 0{,}59\ H_2O$	+	+
A_2	—	—
$0{,}22\ A_2 + 0{,}58\ H_2O$	+	+
A_3	—	—
$0{,}23\ A_3 + 0{,}57\ H_2O$	+	+

	Nach	
	5^h	15^h
$0{,}2\ S + 0{,}6\ H_2O$	—	—
B_1	—	—
$0{,}21\ B_1 + 0{,}59\ H_2O$	—	+
B_2	—	—
$0{,}22\ B_2 + 0{,}58\ H_2O$	—	+
B_3	—	—
$0{,}23\ B_3 + 0{,}57\ H_2O$	—	+

	Nach	
	5^h	15^h
$0{,}2\ S + 0{,}6\ H_2O$	—	—
C_1	—	—
$0{,}21\ C_1 + 0{,}59\ H_2O$	—	+
C_2	—	—
$0{,}22\ C_2 + 0{,}58\ H_2O$	—	+
C_3	—	—
$0{,}23\ C_3 + 0{,}57\ H_2O$	—	+

Zu Normalserum zugesetztes Lipoid in wässeriger Lösung bewirkt in dem früher negativen Serum nach Zusatz von destilliertem Wasser deutliche Flockung und Niederschlag. 0,02, 0,04 und 0,06 einer 1 %igen Kephalin-Cuorin-Lösung sind jene Mengen Lipoid, die ein Normalserum so verändern, daß es sich nach Zusatz von destilliertem Wasser so verhält, wie ein Serum, das deutlich Klausner-positiv ist, d. h. innerhalb 5 bis 8 Stunden nach Wasserzusatz, ausflockt.

Versuch 4.

S = Serum von Urethritis gonorrhoica.
L = 1 %ige Cuorin-Kephalin-Lösung.

$0{,}4\ S + 0{,}02\ L = A_1$
$0{,}4\ S + 0{,}04\ L = A_2$
$0{,}4\ S + 0{,}06\ L = A_3$

	Nach	
	3^h	12^h
$0{,}2\ S + 0{,}6\ H_2O$	—	—
$0{,}21\ A_1 + 0{,}59\ H_2O$	+	+
$0{,}22\ A_2 + 0{,}58\ H_2O$	+	+
$0{,}23\ A_3 + 0{,}57\ H_2O$	+	+
A_1	—	—
A_2	—	—
A_3	—	—

Versuch 5.

S = Serum von Ekzem.
L = 1 %ige Lipoidlösung.

$0,4\,S + 0,02\,L = A_1$
$0,4\,S + 0,04\,L = A_2$
$0,4\,S + 0,06\,L = A_3$

	Nach	
	3^h	12^h
$0,2\,S + 0,6\,H_2O$	—	—
$0,21\,A_1 + 0,59\,H_2O$	+	+
$0,22\,A_2 + 0,58\,H_2O$	+	+
$0,23\,A_3 + 0,57\,H_2O$	+	+
A_1	—	—
A_2	—	—
A_3	—	—

Aus den Versuchen 4 und 5 ergibt sich nochmals die Tatsache, daß Normalsera, d. h. Sera, die mit destilliertem Wasser nicht ausflocken, in Anwesenheit geringer Mengen von Lipoid in intensivem Maße das Phänomen der Ausflockung nach Zusatz von destilliertem Wasser zeigen, während die Kontrollen aus Serum und Lipoid ohne Wasserzusatz klar bleiben, also nicht ausflocken.

Die eben angeführten Versuche ergaben also die interessante Tatsache, daß geringe Mengen Lipoid — es genügten, wie aus den Tabellen ersichtlich ist, 0,02 ccm einer 1 %igen Kephalin-Cuorin-Lösung —, nach Zusatz der entsprechenden Mengen destillierten Wassers, in einem an und für sich negativen Serum eine positive Reaktion hervorrufen. Diese Ausflockung trat nur nach Wasserzusatz auf, während die betreffenden Serum-Lipoidgemische klar blieben und keine Flockung aufwiesen. Daß auch in den letzteren Gemischen unter gewissen Verhältnissen Flockung auftreten kann, darauf soll bei den betreffenden Versuchsanordnungen hingewiesen werden.

Nach den geschilderten Versuchen war es naheliegend zu untersuchen, wie sich natürlicherweise ausflockende Sera, also vor allem Luessera, gegenüber lipoidlösenden Mitteln und aus tierischen Organen (Gehirn) dargestellten Lipoidlösungen verhalten.

Versuch 6.

S_1 = Serum von Lues (1. Exanthem).
S_2 = „ „ „ (Sklerose, 8. Woche).

0,2 S_1 + 0,6 H_2O	+++
0,2 S_2 + 0,6 H_2O	+++
0,2 S_1 nach Äther-extraktion + 0,6 H_2O	–
0,2 S_2 nach Äther-extraktion + 0,6 H_2O	–

Versuch 7.

S_1 = Serum von Lues (Sklerose, 6. Woche).
S_2 = „ „ „ („ 7. „).

0,2 S_1 + 0,6 H_2O	+++
0,2 S_2 + 0,6 H_2O	+++
0,2 S_1 nach Äther-extraktion + 0,6 H_2O	–
0,2 S_2 nach Äther-extraktion + 0,6 H_2O	–

Es wurden also Sera von Luetikern, die nach einigen Stunden nach Zusatz von destilliertem Wasser ausflockten, mit Äther extrahiert; ich erwähne nochmals an dieser Stelle, daß sich zu diesen Versuchen am besten die Sera von Syphylitikern knapp vor Ausbruch der ersten Allgemeinerscheinungen und solche mit diesen Symptomen eignen, weil diese Sera ausnahmslos in kurzer Zeit ausflocken.

Es wurden zu den eben angeführten Versuchen mehrere Kubikzentimeter frischen Luesserums mit Äther extrahiert in der Weise, daß zweimal zu je $^1/_4$ Stunde kräftig mit dem mehrfachen Volumen Äther ausgeschüttelt wurde. Hierauf wurde der darüberstehende Äther abgehoben und das Serum durch einen Luftstrom vom Äther befreit. Mit diesen so behandelten Seren wurden hierauf nebenstehende Versuche angestellt.

Aus den Versuchen 6 und 7 ist zu ersehen, daß nach der Extraktion mit Äther die früher rasch und intensiv ausflockenden Sera jetzt nach Zusatz von destilliertem Wasser keine Spur von Ausflockung zeigten und klar blieben. Diese durch die Ätherextraktion negativ gewordenen Sera konnten jedoch wieder zur Ausflockung gebracht werden (Versuch 8 und 9),

wenn ihnen Lipoidlösung in den angeführten Mengen zugesetzt wurde. Die Sera also flockten nach Zusatz von Gehirnlipoid, nach Verdünnung mit destilliertem Wasser, von neuem aus und verhielten sich so wie frische, nicht extrahierte Luessera.

Versuch 8.

S_1 = Serum von Lues II.
S_2 = dasselbe mit Äther extrahierte Serum.

$0{,}4\ S_2 + 0{,}02\ L = A_1$
$0{,}4\ S_2 + 0{,}04\ L = A_2$
$0{,}4\ S_2 + 0{,}06\ L = A_3$

	Nach	
	3^h	12^h
$0{,}2\ S_1 + 0{,}6\ H_2O$	+++	.+++
$0{,}2\ S_2 + 0{,}6\ H_2O$	—	—
$0{,}21\ A_1 + 0{,}59\ H_2O$	+	+++
$0{,}22\ A_2 + 0{,}58\ H_2O$	+	+++
$0{,}23\ A_3 + 0{,}57\ H_2O$	+	+++
A_1	—	—
A_2	—	—
A_3	—	—

Versuch 9.

S_1 = Serum von behandelter Lues II.
S_2 = " " frischer " II.
S_3 = " " " " II.

S_1 nach Ätherextraktion $= A_1$; $0{,}4\ A_1 + 0{,}02\ L = B_1$
S_2 " " $= A_2$; $0{,}4\ A_2 + 0{,}04\ L = B_2$
S_3 " " $= A_3$; $0{,}4\ A_3 + 0{,}06\ L = B_3$

	Nach		Bemerkungen
	3^h	8^h	
$0{,}2\ S_1 + 0{,}6\ H_2O$	—	+	Mit Hg behandelte Lues. Verzögerte und schwächere Ausflockung
$0{,}2\ A_1 + 0{,}6\ H_2O$	—	—	
$0{,}21\ B_1 + 0{,}59\ H_2O$	+	+++	
B_1	—	—	
$0{,}2\ S_2 + 0{,}6\ H_2O$	—	++	
$0{,}2\ A_2 + 0{,}6\ H_2O$	—	—	
$0{,}22\ B_2 + 0{,}58\ H_2O$	+	+++	
B_2	—	—	
$0{,}2\ S_3 + 0{,}6\ H_2O$	+++	+++	
$0{,}2\ A_3 + 0{,}6\ H_2O$	—	—	
$0{,}23\ B_3 + 0{,}57\ H_2O$	+	+++	
B_3	—	—	

Wie schon erwähnt, genügt eine $^1/_2$ stündige Erhitzung eines positiven Serums auf 56°, um die früher deutliche Flockungsreaktion zum Schwinden zu bringen. Im Verlauf meiner Untersuchungen konnte ich jedoch die Tatsache feststellen, daß Luessera mit sehr intensiver und rasch (in 2 bis 3 Stunden) auftretender Flockungsreaktion, auch nach $^1/_2$ stündigem Erhitzen auf 56°, wenn auch in abgeschwächtem Maße und mit deutlicher Verlangsamung, die Präcipitationsreaktion zeigten. Solche Sera konnten erst durch 1 stündiges Erhitzen inaktiviert werden. Wie sich nun früher positive Sera nach $^1/_2$ stündiger Erhitzung auf 56° gegenüber dem Zusatz von Lipoidlösung in den gewohnten Mengen verhielten, zeigen folgende Versuche.

Versuch 10.

S_1 = Serum von behandelter Lues II.
S_2 = " " unbehandelter Lues II.
S_3 = " " " "

0,4 S_1 $^1/_2{}^h$ bei 56° erhitzt + 0,02 L = A_1
0,4 S_2 " " " " + 0,02 L = A_2
0,4 S_3 " " " " + 0,02 L = A_3

	Nach		Bemerkungen
	3^h	8^h	
0,2 S_1 + 0,6 H_2O	—	+	Behandelte Lues. Geringer Niederschlag.
0,21 A_1 + 0,59 H_2O	—	—	
A_1	—	—	
0,2 S_2 + 0,6 H_2O	—	++	Deutlicher Niederschlag n. 8^h.
0,21 A_2 + 0,59 H_2O	—	—	
A_2	—	—	
0,2 S_3 + 0,6 H_2O	+++	+++	Nach 3^h ausgeflockt.
0,21 A_3 + 0,59 H_2O	—	+++	
A_3	—	+++	
0,2 S_1 $^1/_2{}^h$ bei 56° erhitzt + 0,6 H_2O	—	—	
0,2 S_2 $^1/_2{}^h$ bei 56° erhitzt + 0,6 H_2O	—	—	
0,2 S_3 $^1/_2{}^h$ bei 56° erhitzt + 0,6 H_2O	—	+++	

Im folgenden Versuche wurde untersucht, wie sich normale, d. h. negative Sera und positive Sera anderweitig kranker Individuen nach Erhitzen auf 56° und Zusatz von Lipoidlösung verhielten.

Versuch 11.

S_1 = Serum von Lupus vulgaris.
S_2 = „ „ Ekzem.
S_3 = „ „ Ulcus molle.
S_4 = „ „ Urethritis gon.
S_5 = „ „ Rhinosklerom.
S_6 = „ „ Tbc. pulmonum.
S_7 = „ „ Lupus vulgaris.

0,4 S_1 $^1/_2{}^h$ auf 56° erhitzt + 0,06 L = A_1
0,4 S_2 „ „ „ „ + 0,06 L = A_2
0,4 S_3 „ „ „ „ + 0,06 L = A_3
0,4 S_4 „ „ „ „ + 0,06 L = A_4
0,4 S_5 „ „ „ „ + 0,06 L = A_5
0,4 S_6 „ „ „ „ + 0,06 L = A_6
0,4 S_7 „ „ „ „ + 0,06 L = A_7

0,2 S_1 + 0,6 H_2O	—
0,23 A_1 + 0,57 „	—
0,2 S_2 + 0,6 „	—
0,23 A_2 + 0,57 „	—
0,2 S_3 + 0,6 „	—
0,23 A_3 + 0,57 „	—
0,2 S_4 + 0,6 „	+++
0,23 A_4 + 0,57 „	—
0,2 S_5 + 0,6 „	+++
0,23 A_5 + 0,57 „	—
0,2 S_6 + 0,6 „	+++
0,23 A_6 + 0,57 „	+++
0,2 S_7 + 0,6 „	—
0,23 A_7 + 0,57 „	—

Es ist durch die Versuche 10 und 11 die Tatsache festgestellt worden, daß Sera, die nach $^1/_2$ stündigem Erhitzen auf 56° mit destilliertem Wasser keine Fällung mehr ergeben, auch nach Zusatz von Lipoidlösung keine Ausflockung mehr zeigen; daß aber Sera, die sehr rasch und intensiv ausflockten, das nach Erhitzen auf 56° noch taten, wenn auch die Präcipitation langsamer eintrat. Diese letzteren Sera konnten nun durch Zusatz von Lipoidlösung nach Verdünnung mit destilliertem Wasser stärker zur Ausflockung gebracht werden; bei diesen Seren trat auch in dem Serum-Lipoidgemisch ohne Zusatz von destilliertem Wasser häufig eine Flockung auf, ein Phänomen, das mit der Porges-Meierschen Reaktion eine gewisse Ähnlichkeit besitzt.

Nach diesen Befunden war es von großem Interesse, festzustellen, ob und in welcher Weise die Lipoidlösung durch $^1/_2$ stündiges Erhitzen auf 56° verändert wird.

Versuch 12.

S_1 = Serum von Lues (Sklerose mit 1. Exanthem).
S_2 = Serum von Prurigo.
L_1 = 1 %ige Kephalin-Cuorin-Lösung, $^1/_2{}^h$ bei 56° erhitzt.

0,4 S_1 $^1/_2{}^h$ bei 56° erhitzt + 0,02 L = A_1
0,4 S_1 + 0,02 L_1 = B_1
0,4 S_2 $^1/_2{}^h$ bei 56° erhitzt + 0,02 L = A_2
0,4 S_2 + 0,02 L_1 = B_2

0,2 S_1 + 0,6 H_2O	+++
0,21 A_1 + 0,59 „	—
0,21 B_1 + 0,59 „	+++
0,2 S_2 + 0,6 „	—
0,21 A_2 + 0,59 „	—
0,21 B_2 + 0,59 „	+++

Es beweist demnach der Versuch 12, daß die Lipoidlösung durch $^1/_2$ stündiges Erhitzen auf 56° in keiner Weise beeinflußt wurde und, frischen Normalseren zugesetzt, ebenso wie in mit Äther extrahierten Seren, eine deutliche Ausflockung nach Zusatz von destilliertem Wasser hervorrief.

Ich habe deshalb eine Reihe von Versuchen angestellt, um den Beweis erbringen zu können, ob die lipoide Komponente im Serum trotz $^1/_2$ stündigem Erhitzen auf 56° ungestört wirksam ist.

Versuch 13.

S = Serum von Ekzem.
S_1 = dasselbe Serum nach $^1/_2$stünd. Erhitzen auf 56°.
L = 1 %ige Kephalin-Cuorin-Lösung.

0,4 S_1 + 0,06 L = A.

	Nach	
	5 h	10 h
0,2 S + 0,6 H_2O	—	—
0,2 S_1 + 0,6 H_2O	—	—
0,23 A + 0,2 S + 1,17 H_2O	+	++
0,23 A + 0,2 S_1 + 1,17 H_2O	—	—

Versuch 14.

S = Serum von Lues (Sklerose mit Exanthem).
S_1 = Serum desselben Falles $^1/_2{}^h$ bei 56° erhitzt.
N = Normalserum von Ekzem.

	Nach	
	8^h	12^h
0,2 S + 0,6 H_2O	+++	+++
0,2 N + 0,6 H_2O	—	—
1 ccm N + 3 ccm H_2O + 1 ccm S_1	—	—

Versuch 15.

N = Normalserum von Ulc. molle.
N_1 = dasselbe Serum $^1/_2{}^h$ bei 56° erhitzt.
L = 1%ige Cuorin-Kephalin-Lösung.

0,4 N + 0,06 L = A;
0,4 N_1 + 0,06 L = A_1;
0,4 N + 0,06 L; das ganze $^1/_2{}^h$ bei 56° erhitzt = A_2.

	Nach	
	8^h	12^h
0,2 N + 0,6 H_2O	—	—
0,2 N_1 + 0,6 H_2O	—	—
0,23 A + 0,57 H_2O	+++	+++
0,2 N + 0,23 A_1 + 1,17 H_2O	+++	+++
0,2 N + 0,23 A_2 + 1,17 H_2O	—	—

Während, wie schon Versuch 12 gezeigt hat, die Erhitzung des Lipoids auf 56° keine Beeinflussung seiner Fähigkeit zeigte, frisches Normalserum so zu verändern, daß es auf Zusatz der 3 fachen Menge Wassers ausflockt, so gelang es nicht, im durch Erhitzen inaktivierten (früher hoch positiven) Luesserum nach Zusatz von Normalserum und 3 facher Wasserverdünnung eine Ausflockung zu erzielen, obzwar in diesem Gemisch die Serumlipoide von 1 ccm Luesserum auf 0,2 ccm Normalserum einwirkten. In vollständiger Übereinstimmung mit diesem Verhalten ergibt Versuch 15, daß auch in dem durch Erhitzen inaktivierten (früher stark positiven) Gemenge von Lipoid und Normalserum das Lipoid die Fähigkeit verloren hat, zugesetztes frisches Normalserum so zu verändern, daß es die Fällungsreaktion zeigt, während das ebenfalls nicht mit Wasser reagierende Gemenge von erhitztem Normalserum

und nachher zugesetztem Lipoid nach $^3/_4$ stündigem Einwirken noch imstande war, frisch zugesetztes Normalserum durch Wasser fällbar zu machen.

Im folgenden Versuche habe ich Rinderserum, das bekanntlicherweise gleichfalls das Ausflockungsphänomen mit destilliertem Wasser zeigt, mit einem stark ausflockenden Luesserum verglichen.

Versuch 16.

S = Luesserum in 3^h ausgeflockt.
S_1 = Rinderserum in 4^h ausgeflockt.
L = 1 %ige Kephalin-Cuorin-Lösung.

	frisch	1 Tag	2 Tage	3 Tage
S	+	+	schwach +	—
S $^1/_2{}^h$ bei 56° erhitzt	+	+	—	—
S $^1/_2{}^h$ bei 56° erhitzt + L	+	+	+	+
S mit Äther extrah.	—	—	—	—
S mit Äther extrah. + L	+	+	+	+
S $^1/_2{}^h$ bei 62° erhitzt	—	—	—	—

	frisch	1 Tag	2 Tage	3 Tage
S_1	+	+	+	—
S_1 $^1/_2{}^h$ bei 56° erhitzt	+	+	—	—
S_1 $^1/_2{}^h$ erhitzt + L	+	+	+	+
S_1 mit Äther extrah.	—	—	—	—
S_1 mit Äther extrah. + L	+	+	+	+
S_1 $^1/_2{}^h$ bei 62° erhitzt	—	—	—	—

Es zeigt also dieser vergleichende Versuch zwischen Lues- und Rinderserum eine vollständige Übereinstimmung in bezug auf das Präcipitationsphänomen und die bisher in den Versuchen ausgeführten Variationen. Die Fällungsreaktion schwindet in beiden Seren allmählich nach 3 bis 4 Tagen.

Nach $^1/_2$ stündigem Erhitzen bei 56° ist wohl der Eintritt der Reaktion in beiden Seren verlangsamt, tritt jedoch dann in gleicher Intensität auf; diese erhitzten Sera flocken aber nach 2 Tagen nicht mehr aus.

Durch künstlich dargestelltes Lipoid konnte sowohl in den auf 56° erhitzten als auch in den mit Äther extrahierten Seren auch noch nach 4 Tagen eine Fällung hervorgerufen werden. Lues- und Rinderserum läßt sich durch $^1/_2$ stündiges Erhitzen auf 62° vollständig inaktivieren in der Weise, daß jetzt nach Zusatz von destilliertem Wasser keine Präcipitation eintritt.

Um den Beweis zu erbringen, daß die durch Äther extrahierten Lipoide das Phänomen der Ausflockung luetischer Sera nach Zusatz von destilliertem Wasser bedingen, mußte außer dem sicher stehenden Befunde, daß nach Ätherextraktion

die Fällung nicht mehr eintritt, die Tatsache festgestellt werden, daß die mit Äther extrahierten Lipoide imstande sind, eine Fällung in dem extrahierten und in negativen Normalseren nach Zusatz von destilliertem Wasser hervorzurufen.

Es wurden zu diesem Zwecke 2 ccm Serum von Lues, welches in einigen Stunden ausgeflockt hatte, mit Äther zweimal zu je einer Viertelstunde extrahiert, der Äther abgehoben durch einen Luftstrom weggeblasen und der Ätherrückstand mit der 3fachen Menge destillierten Wassers aufgenommen und unter Verreiben nach Möglichkeit gelöst, klar abzentrifugiert und mit der opalescenten Lipoidlösung folgende Versuche angestellt.

Versuch 17.

S = Serum von Lues II.

S_1 = dasselbe Serum nach Ätherextraktion.

L = Ätherrückstand aus 2 ccm S in 6 ccm destillierten Wassers gelöst. Es entsprechen dann 0,2 Serum 0,6 der gelösten Lipoide.

	Nach	
	6^h	12^h
0,2 S + 0,6 H_2O	++	+++
0,2 S_1 + 0,6 H_2O	—	—
0,2 S_1 + 0,6 L	—	++

Versuch 18.

S = Serum von Ekzem.

S_1 = Dasselbe Serum $^1/_2{}^h$ bei 56° erhitzt.

L = Lues-Serum-Lipoid-Lösung wie in Versuch 16.

	Nach	
	6^h	12^h
0,2 S + 0,6 H_2O	—	—
0,2 S_1 + 0,6 H_2O	—	—
0,2 S + 0,6 L	—	++
0,2 S_1 + 0,6 L	—	—

Es gelang demnach mit den aus dem Luesserum extrahierten und in Wasser gelösten Lipoiden, in dem nach Ätherextraktion negativen Serum, von neuem eine Fällung hervorzurufen, desgleichen trat bei negativen Normalseren nach Zusatz dieser durch Extraktion gewonnenen Lipoide eine Präcipitation im frischen Serum auf, während dieselbe in auf 56° erhitztem Serum, entsprechend den Befunden bei von Natur

aus positiven Seren oder solchen mit Zusatz künstlich dargestellten Lipoids, ausblieb. Um zu sehen, ob konzentriertere Lösungen der mit Äther extrahierten Lipoide das Präcipitationsphänomen deutlicher bzw. intensiver gestalten können, wurden folgende Versuche ausgeführt.

Versuch 19.

S = Serum von Lues II.
S_1 = Serum desselben Falles nach Ätherextraktion.
L = Lipoidlösung aus 2 ccm S durch Ätherextraktion gewonnen und in 2 ccm destillierten Wassers gelöst.

	Nach	
	6^h	12^h
0,2 S + 0,6 H_2O	++	+++
0,2 S_1 + 0,6 H_2O	—	—
0,2 S_1 + 0,6 L	+	+++

Versuch 20.

S = Serum von Ekzem.
S_1 = Dasselbe Serum $^1/_2{}^h$ bei 56° erhitzt.
L = Lues-Serum-Lipoid-Lösung wie bei Versuch 18.

	Nach	
	6^h	12^h
0,2 S + 0,6 H_2O	—	—
0,2 S + 0,6 L	+	+++
0,2 S_1 + 0,6 H_2O	—	—
0,2 S_1 + 0,6 L	—	—

Es zeigen also die Versuche 17 und 18, daß durch eine stärkere Konzentration der aus dem Luesserum gewonnenen Lipoidlösung ein rascheres und intensiveres Auftreten der Flockungsreaktion erzielt werden konnte.

Schließlich habe ich auch Untersuchungen angestellt dahin zielend, ob es gelingt, durch die Lipoide, die ich aus Normalseren extrahierte, in Normalseren nach Zusatz derselben und Verdünnung mit destilliertem Wasser, Ausflockung zu erzielen. Zu diesem Zwecke wurden wieder aus 2 ccm Normalserum mittels Äther die Lipoide extrahiert und der Ätherrückstand in 2 ccm destilliertem Wasser gelöst, abzentrifugiert und die Lösung frischem Normalserum zugesetzt.

Versuch 21.

S = Normalserum von Prurigo.
S_1 = Dasselbe Serum mit Äther extrahiert.
S_2 = Das Normalserum $^1/_2{}^h$ bei 56° erhitzt.
L = Lipoidlösung aus 2 ccm Serum in 2 ccm dest. Wassers.

	Nach	
	6^h	12^h
0,2 S + 0,6 H_2O	—	—
0,2 S_1 + 0,6 H_2O	—	—
0,2 S_2 + 0,6 H_2O	—	—
0,2 S_1 + 0,6 L	—	++
0,2 S_2 + 0,6 L	—	—
0,2 S + 0,6 L	—	++

Es gelingt demnach durch eine konzentriertere Lipoidlösung, die durch Ätherextraktion eines Normalserums gewonnen wurde, in dem negativen Normalserum und in dem durch Äther extrahierten Normalserum eine deutliche, wenn auch schwache Flockung hervorzurufen, wenn man, wie ich es bei meinen Versuchen getan habe, den Lipoidgehalt des Serums auf das 4fache der Norm erhöht.

Ich habe, wie der Versuch 20 zeigt, den Ätherextrakt aus 2 ccm Serum in 2 ccm destilliertem Wasser gelöst und davon 0,6 ccm zu 0,2 ccm des unextrahierten Serums zugesetzt, so daß dann in diesem Gemisch die Lipoide von 0,8 ccm Serum vorhanden waren.

III.

Meine Untersuchungsresultate lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Jedes die Ausflockungsreaktion gebende Serum läßt sich durch Ätherextraktion oder Erhitzung inaktivieren. Durch Ätherextraktion inaktiviertes Serum läßt sich durch nachträglichen Zusatz von Gehirnlipoiden (Lecithin-Cuorin-Kephalin-Fraktion) wieder aktivieren. Das durch Hitze inaktivierte Serum läßt sich durch Lipoid nicht reaktivieren.

2. Ein negativ reagierendes Normalserum läßt sich durch Gehirnlipoid aktivieren, erhitztes Normalserum jedoch nicht.

3. Durch Gehirnlipoid positiv gemachtes Serum läßt sich durch Erhitzen inaktivieren.

4. Das Erhitzen des Lipoids ist unwirksam, d. h. das Lipoid behält auch nach dem Erhitzen seine volle Wirksamkeit.

5. Die künstliche Flockungsreaktion tritt wie die natürliche in der Wärme langsamer auf.

6. Die künstliche Präcipitationsreaktion, durch Erhitzen inaktiviert, wird auf neuerlichen Serumzusatz nicht positiv. Demnach wird das Lipoid bei Anwesenheit von Eiweiß durch Erhitzen inaktiviert.

7. Auch für die künstliche Fällungsreaktion ist das Verhältnis von Serum zu destilliertem Wasser 1:3 das optimale.

8. Die natürliche Präcipitationsreaktion, wenn durch Erhitzen inaktiviert, läßt sich durch frisches Normalserum nicht wieder aktivieren.

9. Ein positives Serum, durch Ätherextraktion inaktiviert, läßt sich durch Zusatz des in destilliertem Wasser gelösten Ätherextraktes reaktivieren, negatives Normalserum wird durch den Zusatz desselben positiv. Auch stärkere Konzentrationen des aus negativem Normalserum gewonnenen und in destilliertem Wasser gelösten Ätherextraktes vermögen, Normalserum zugesetzt, in demselben eine Ausflockung hervorzurufen.

10. Von den verschiedenen Fraktionen der Gehirnlipoide sind wirksam die Cuorin-Kephalin-Fraktion, Lecithin und Protagon.

Durch diese Untersuchungen wurde festgestellt, daß nicht vermehrte Globuline das Präcipitationsphänomen nach Zusatz von destilliertem Wasser zu dem betreffenden Serum hervorrufen, daß vielmehr die Anwesenheit wahrscheinlich vermehrter Lipoide im Serum bei der Lues in gewissen Stadien und auch bei anderen Infektionskrankheiten die von mir angegebene Präcipitationsreaktion bedingt.

Die Abhängigkeit spezifischer Fällungsreaktionen von der Wasserstoffionenkonzentration.

Von

L. Michaelis und H. Davidsohn.

(Aus dem biologischen Laboratorium des städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 26. Oktober 1912.)

Unter einer spezifischen Fällung verstehen wir in Übereinstimmung mit dem bestehenden Sprachgebrauch die Fällung, die ein Antigen mit seinem spezifischen Antikörper erzeugt, also die in vitro sichtbaren Reaktionen der Präcipitine und der damit aufs innigste verwandten Agglutinine. Bei diesen Fällungen handelt es sich ganz allgemein gesprochen stets um die gegenseitige Fällung zweier Kolloide, und es soll die Aufgabe dieser Arbeit sein, diese Fällung mit der banalen Fällung zweier Kolloide, insbesondere zweier amphoterer Kolloide, zu vergleichen. Der Anlaß, diese Frage aufzuwerfen, war dadurch gegeben, daß wir kürzlich[1]) über das Wesen der unspezifischen Fällungen zweier Kolloide einen gewissen Aufschluß geben konnten. Die gegenseitige Fällung zweier amphoterer Kolloide war nämlich von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung abhängig und erreichte ein Maximum, wenn die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung so beschaffen war, daß sie gleichzeitig dem einen Kolloid eine positive, dem anderen eine negative Ladung erteilte. Das Fällungsoptimum lag daher zwischen den isoelektrischen Punkten der einzelnen Kolloide. Die Fällung der Verbindung zweier Kolloide war daher, ebenso wie die Fällung eines einzelnen Kolloids, von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung in hervorragendem Maße abhängig.

Unsere Frage war daher zunächst, ob auch die Entstehung der spezifischen Fällungen in gleichem Maße von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung abhängig sei. Es wurden

[1]) Diese Zeitschr. 39, 496.

zu diesem Zweck Präcipitine mit ihrem Präcipitogen und ferner Agglutinine mit ihren homologen Bakterien vermischt, diese Mischungen durch Zusatz von Regulatoren auf verschiedene Wasserstoffionenkonzentrationen gebracht und untersucht, innerhalb welches Bereiches von H-Ionenkonzentration die Präcipitationen bzw. Agglutinationen auftreten. Die experimentelle Schwierigkeit liegt nun darin, daß das Präcipitinserum allein, und ebenso das präcipitogene Serum allein, ferner auch das Agglutininserum allein und ganz besonders die Bacillensuspension allein durch bestimmte Wasserstoffionenkonzentrationen ausgeflockt werden. Bei den Seren sind es die Globuline, die ausflocken[1]), und die Ausflockung der Bacillensuspension wurde kürzlich beschrieben[2]). Es handelte sich also stets darum, wenn eine Fällung entstand, diese sicher als eine spezifische Fällung, als eine Ausflockung der Antigen-Antikörperverbindung zu erkennen und von der Ausflockung der isolierten Komponenten zu unterscheiden. In unserem früheren Beispiel, Nucleinsäure-Albumin z. B., war diese Entscheidung nicht schwer, denn das Fällungsoptimum der einzelnen Komponenten war von dem der Verbindung so weit entfernt, daß eine Verwechslung nicht möglich war. Bei den spezifischen Fällungen war das von vornherein nicht so leicht. Wir hatten aber hier dafür die Möglichkeit, die wirksamen Substanzen in so hoher Verdünnung anzuwenden, daß sie isoliert keine deutlichen Fällungen ergaben und jede auftretende Fällung auf die spezifische Verbindung bezogen werden konnte.

Die Versuche hatten folgendes Resultat.

I. Versuche mit Typhusagglutinin.

Dem Plane gemäß wird nacheinander der isoelektrische Punkt des Agglutinins, der der agglutinablen Substanz und zuletzt das Flockungsoptimum der Verbindung beider bestimmt.

a) Der isoelektrische Punkt des Agglutinins.

Daß die Antikörper im allgemeinen zu den elektroamphoteren Stoffen gehören, wurde zuerst von Landsteiner und

[1]) P. Rona und L. Michaelis, diese Zeitschr. 28, 193, 1910.

[2]) L. Michaelis, Deutsche med. Wochenschr. **1911**, Nr. 21; M. Beniasch, Zeitschr. f. Immunitätsforschung 12, 268, 1912.

Pauli[1]) festgestellt. Sie fanden kathodische Wanderung derselben in saurer Lösung, anodische Wanderung in alkalischer Lösung. Wir konnten unter Heranziehung unserer Erfahrungen der Wanderungsmethode jetzt den Versuch unternehmen, den isoelektrischen Punkt des Agglutinins etwas genauer zu bestimmen.

Tabelle I.

Überführungsversuche mit Typhusagglutinin.

Versuch Nr.			[H˙] in d. Mittelflüssigkeit nach Stromdurchgang gemessen	Agglutinationstiter der Flüssigkeiten nach dem Stromdurchgang		
				Mitte	Anode	Kathode
1	Agglutinin n/3-prim. Phosphat n/3-sek. „ dest. Wasser	1,0 0,2 0,4 13,4	$1{,}15 \cdot 10^{-7}$	1/1280 stark, 1/2560 schwach	1/40 stark, 1/80 schwach	0
2	Agglutinin n/3-prim. Phosphat n/3-sek. „ dest. Wasser	1,0 0,5 0,25 13,25	$2{,}6 \cdot 10^{-7}$	1/640 stark, 1/1280 schwach	1/40 stark, 1/80 schwach	0
3	Agglutinin n/3-prim. Phosphat n/3-sek. „ dest. Wasser	1,0 0,9 0,09 13,01	$1{,}0 \cdot 10^{-6}$	1/640 stark, 1/1280 schwach	1/80 stark	1/40 stark, 1/80 schwach
4	Agglutinin n/10-Natriumacetat n/10-Essigsäure dest. Wasser	0,9 3,0 0,75 8,35	$5{,}1 \cdot 10^{-6}$	1/640 stark, 1/1280 schwach	1/320 stark	1/80 stark, 1/160 schwach
5	Agglutinin n/10-Natriumacetat n/10-Essigsäure dest. Wasser	0,9 3,0 3,0 8,1	$2{,}0 \cdot 10^{-5}$ (berechnet)	1/640 stark, 1/1280 schwach	0	1/40 stark

Der Stromdurchgang betrug stets 4 Stunden, die Klemmspannung 110 Volt. Das verwendete Agglutinin (Kaninchenserum) hatte einen Titer von mehr als 1 : 10000. Die Angaben des Agglutinationstiters sind folgendermaßen zu verstehen: „1/2500 stark, 1/2500 schwach" bedeutet: Die betreffende Flüssigkeit (die selbst schon eine hohe Verdünnung des Agglutinins darstellt) gibt in einer Verdünnung von 1/1200 eine starke Agglutination, bei 1/2500 eine unvollkommene, und bei 1/5000 überhaupt keine Agglutination mit Typhusbacillenaufschwemmung.

Hieraus ergibt sich der isoelektrische Punkt zwischen $1 \cdot 10^{-6}$ und $5 \cdot 10^{-6}$, ein Wert, der innerhalb der Versuchsfehler identisch ist mit dem des Serumglobulins[2]) ($4 \cdot 10^{-6}$). Also auch

[1]) Landsteiner und Pauli, XI. Kongr. f. inn. Med. 1908, 57.

[2]) P. Rona und L. Michaelis, diese Zeitschr. 28, 193, 1910.

in dieser Beziehung besteht ein inniger Zusammenhang von Antikörpern mit dem Serumglobulin, wie er ja auch bezüglich der Aussalzungsgrenzen besteht.

b) Der isoelektrische Punkt der agglutinablen Substanz.

Die agglutinable Substanz läßt sich nach R. Kraus[1]) von den Typhusbacillen dadurch trennen, daß man eine ältere Kultur der Bacillen durch ein Pukall-Filter filtriert. Das bacillenfreie Substrat enthält die agglutinable Substanz, die durch Maceration aus den Bacillenleibern in die Lösung gegangen ist und sich dadurch dokumentiert, daß diese Lösung mit Typhusagglutinin einen Niederschlag gibt. In Anlehnung an diese Methode erhielten wir die agglutinable Substanz der Typhusbacillen auf folgende Weise. Es wurden 8 Typhuskulturen auf schrägen Agarröhrchen nach 24 stündigem Wachstum in 300 ccm destilliertem Wasser mit einem Zusatz von $^1/_2{}^0/_0$ Phenol aufgeschwemmt, 3 Wochen bei Zimmertemperatur gelassen und dann scharf abzentrifugiert. Die Bacillen lassen sich so verhältnismäßig leicht vollkommen abzentrifugieren und die kaum opalescierende Flüssigkeit gibt mit Typhysagglutinin einen spezifischen Niederschlag.

Wir hätten nun durch Wanderungsversuche mit dieser Flüssigkeit den isoelektrischen Punkt direkt bestimmen können, jedoch wäre das sehr schwierig, weil es nicht leicht ist, die an sich schon sehr verdünnte Lösung des Agglutinins im Wanderungsversuch, wo wir immer nur sehr geringe Anteile der Gesamtmenge durch den elektrischen Strom überführen können, mit ausreichender Schärfe nachzuweisen, wie dies beim Agglutinin möglich gewesen war. Wir wählten desbalb eine indirekte Methode. Wir konnten nämlich früher zeigen, daß die agglutinable Substanz des Typhusbacillus ein Flockungsoptimum bei einer $[H^{\cdot}]$ von $4 \cdot 10^{-5}$ hat. Die Identität der säurefällbaren Substanz mit der spezifisch-agglutinablen Substanz konnte Beniasch[2]) dadurch wahrscheinlich machen, daß er die Parallelität der Säureagglutination und der spezifischen Agglutination bei Typhusstämmen verschiedener Agglutinabilität nach-

[1]) R. Kraus, Wiener klin. Wochenschr. 1907.

[2]) M. Beniasch, Zeitschr. f. Imm.-Forschung 12, 268, 1912.

wies. Diesen Wahrscheinlichkeitsbeweis können wir jetzt auf folgende Weise zur Gewißheit erheben:

Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde in der Weise, wie früher[1]) beschrieben, durch Acetatgemische auf verschiedene [H˙] gebracht und festgestellt, daß bei derselben [H˙], die das Säureagglutinationsoptimum der Bacillen darstellt, eine Flockung in unserer Flüssigkeit entsteht. Nunmehr wurde in größerem Maßstabe diese Flockung hergestellt, indem 50 ccm der Flüssigkeit mit 10 ccm eines Acetatgemisches von der Zusammensetzung: 5 ccm n-NaOH, 15 ccm n-Essigsäure, 80 ccm Wasser versetzt wurden. Die Entstehung der Flockung wurde abgewartet (etwa 1 Stunde), dann die Flockung scharf abzentrifugiert, die Flüssigkeit verworfen und die Flockung in wenigen Kubikzentimeter Wasser und einigen Tropfen $^{n}/_{8}$-sekundärem Phosphat (zur Neutralisierung der Reste des anhaftenden Acetatgemisches) gelöst. Jetzt haben wir also eine reine Lösung des säureflockbaren Körpers vor uns. Nunmehr wird eine Probe dieser Lösung mit etwas Typhusagglutinin (hochwertiges Typhus-Kaninchenserum) versetzt und gefunden, daß rasch eine energische Flockung eintritt. Damit ist erwiesen, daß die säureflockbare Substanz gegen spezifisches Agglutinin reagiert und daher mit der spezifisch-agglutinablen Substanz identisch ist. Nunmehr ist auch der isoelektrische Punkt der agglutinablen Substanz sofort bekannt, er ist nämlich identisch mit dem Flockungsoptimum der Typhusbacillen bzw. der Bacillensubstanzlösung. Für die Behauptung, daß das Säureflockungsoptimum mit dem isoelektrischen Punkt der flockbaren Substanz identisch ist, brauchen wir heute auf Grund unserer zahlreichen Einzelerfahrungen keinen besonderen Beweis mehr zu erbringen. Es ist somit erwiesen, daß der isoelektrische Punkt des Agglutinins = ca. $4 \cdot 10^{-6}$, der der agglutinablen Substanz ca. $4 \cdot 10^{-5}$ ist.

c) Das Agglutinationsoptimum der Bacillenagglutininverbindung.

Dieser Tabelle II kann man folgendes entnehmen: Das reine Säureagglutinationsoptimum (Versuch a) liegt etwa bei $5 \cdot 10^{-5}$. Bei Zusatz äußerst starker Agglutininverdünnungen

[1]) L. Michaelis, Deutsche med. Wochenschr. 1911, Nr. 21.

Tabelle II.

Je 2 ccm Typhusbacillenaufschwemmung in destilliertem Wasser werden vermischt mit 0,2 ccm einer n-fach verdünnten Lösung von Agglutininserum und folgenden Mengen Natriumacetat und Essigsäure:

	Röhrchen Nr.												
	1	2	3	4	5[1])	6[1])	7	8	9[2])	10	11	12	13
$^{n}/_{10}$-Na-Acetat	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Parallelvers. ohne Acetatgemisch. Statt dessen 0,85% NaCl-Lös., d. h. also die gewöhnl. Methode d. Agglutination.
$^{n}/_{100}$-Essigsäure	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	—	—	—	—	—	—	
$^{n}/_{10}$-Essigsäure	—	—	—	—	—	—	0,32	0,64	1,28	—	—	—	
$^{n}/_{1}$-Essigsäure	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,26	0,51	1,2	
Wasser	2,25	2,2	2,1	1,0	1,5	0,7	1,98	1,66	1,02	2,04	1,79	1,1	
$[H^{\cdot}] =$	$2 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-7}$	$1,6 \cdot 10^{-6}$	$3,2 \cdot 10^{-6}$	$6,4 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	—
a) $n = 1/\infty$	0	0	0	0	0	0	0	×	××	(×)	0	0	0
b) $n = 1/4000$	0	0	0	0	0	0	0	×	××	×	0	0	0
c) $n = 1/2500$	0	0	0	0	0	0	0	×	××	0?	0	0	0
d) $n = 1/2000$	×	×	×	0	0	0	0	×	××	0?	0	0	(×)
e) $n = 1/1000$	×	×	×	×	×	0	0	×	××	×	0	0	(×)
f) $n = 1/800$	××	××	××	×	(×)	(×)	(×)	×	(×)	0	0	0	×
g) $n = 1/600$	××	××	××	×(×)	(×)	(×)	(×)	(×)	0	0	0	0	×
h) $n = 1/500$	××	××	××	××	××	××	××	×	0	0	0	0	××
i) $n = 1/300$	××	××	××	××	××	××	××	××	××	××	××	(×)	××
k) $n = 1/100$	×××	×××	×××	×××	×××	×××	×××	××××	××××	××××	××××	×××	×××
l) $n = 1/10$	×××	×××	×××	×××	×××	×××	×××	××××	××××	××××	××××	××××	×××

0 bedeutet keine Agglutination, 0? zweifelhafte Agglutination, (×) schwache, unvollkommene Agglutination, × Agglutination. Die Anzahl der Kreuze ist ein Symbol für, die Stärke derselben, d. h. für die Absetzungsgeschwindigkeit und Massigkeit des Niederschlags.

---

[1]) Isoelektrische Zone des reinen Agglutinins. [2]) Isoelektrischer Punkt der reinen agglutinablen Substanz, d. h. Optimum der reinen Säureagglutination.

(Versuch b, c) tritt keine merkliche Änderung der Erscheinungen ein. Bei höherer Konzentration (d) des zugefügten Agglutinins markiert sich neben der Säureagglutination (um $5 \cdot 10^{-5}$) eine schwache spezifische Agglutination abwärts von $8 \cdot 10^{-6}$. Zwischen $8 \cdot 10^{-7}$ und $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ tritt keine Agglutination ein. Es verhalten sich die Typhusbacillen zum Teil noch wie unbeladene, jedoch bemerkt man zum anderen Teil schon ihre Beladung mit Agglutinin. Bei noch konzentrierterem Agglutinin (Versuch e bis g) verbreitert sich die Zone der spezifischen Agglutination und verschwindet allmählich das Säurefällungsoptimum. Bei noch höherer Konzentration des Agglutinins (Versuch h, i, k, l) verbreitert sich die Zone der spezifischen Agglutination immer weiter, sogar in das Gebiet der Säureagglutination hinein und überschreitet sie sogar. Je konzentrierter das Agglutinin wird, desto weniger ist die Agglutination von der $[H^{\cdot}]$ der Lösung abhängig. Zu erwähnen ist noch, daß bei den höchsten Agglutininkonzentrationen (Versuch l) die schon bei einer $[H^{\cdot}]$ von 10^{-7}, also bei neutraler Reaktion (und auch bei alkalischer Reaktion) vorhandene Agglutination mit zunehmender Acidität eher noch energischer wird (Röhrchen 8 bis 12). Jedoch ist hier die Agglutination in allen Röhrchen so energisch, daß wir auf den graduellen Unterschied zwischen den mit ××× und ×××× bezeichneten Resultaten kein großes Gewicht legen.

Besonders sei nochmals auf Versuch d und e hingewiesen, die mit ihren zwei getrennten Agglutinationszonen den Schlüssel für das Verständnis geben.

Wir erkennen hier, daß die spezifische Agglutination in ziemlich weitem Umfange von der H-Konzentration der Lösung unabhängig ist. Eine annähernd neutrale Reaktion ist jedenfalls eine günstige Bedingung für die spezifische Agglutination, besonders bei kleinen Agglutininmengen. Bei neutraler Reaktion hat aber, wie aus der Lage der soeben bestimmten isoelektrischen Punkte hervorgeht, sowohl das Agglutinin wie die agglutinable Substanz eine positive Ladung, und es ist somit erwiesen, daß die beiden bei neutraler Reaktion miteinander reagierenden Substanzen die gleiche elektrische Ladung haben. Ihre Affinität kann daher nicht auf einer gegensätzlichen elektrischen Ladung beruhen. Bei einer $[H^{\cdot}]$ von ca. $1 \cdot 10^{-5}$

haben die beiden Substanzen eine gegensätzliche Ladung; die agglutinable Substanz ist noch elektropositiv, das Agglutinin schon elektronegativ. Trotzdem zeichnet sich dieser Punkt, $1 \cdot 10^{-5}$, für die spezifische Agglutination in keiner Weise vorteilhaft aus, im Gegenteil, dieser Punkt stellt ungefähr die Grenze dar, bei der die spezifische Agglutination bei der geringsten überhaupt noch wirksamen Agglutininmenge noch erhältlich ist (Versuch d, e). Die beiden Substanzen reagieren also am besten aufeinander, wenn sie beide negativ geladen sind, reagieren aber beide bei Gegenwart reichlicher Agglutininmenge so gut wie unabhängig von ihrer elektrischen Ladung stets miteinander.

Obige Tabelle umspannt einen [H˙]-Bereich von $2 \cdot 10^{-7}$ bis $4 \cdot 10^{-4}$. Es war wünschenswert, diesen Bereich nach der alkalischen Seite noch zu verbreitern. Dies wurde auf folgende Weise mit Phosphatgemischen erreicht:

Tabelle III.

Typhusbacillen je 2 ccm.

	Röhrchen									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$^{n}/_{10}$-sekundäres Na-Phosphat	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
$^{n}/_{100}$-primäres Na-Phosphat	0,0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	—	—	—
$^{n}/_{10}$-primäres Na-Phosphat	—	—	—	—	—	—	—	0,32	0,64	1,28
Wasser	2,3	2,25	2,2	2,1	1,9	1,5	0,7	1,98	1,66	1,02
[H˙] = ca.	10^{-10}	$2 \cdot 10^{-9}$	$4 \cdot 10^{-9}$	$8 \cdot 10^{-9}$	$10 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-8}$	$6 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-7}$
Agglutinin ($^{1}/_{1000}$)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Resultat nach 2 Std. . . .	0	0	0	0	0	0	×	×	×	×
24 Std. . . .	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Derselbe Versuch, aber sekundäres und primäres Phosphat vertauscht:										
[H˙] = ca.	$5 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$2{,}5 \cdot 10^{-6}$	$1{,}2 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-8}$	$1{,}5 \cdot 10^{-8}$	$7 \cdot 10^{-9}$
Resultat nach 2 Std. . . .	0	0	0	0	0	0?	×	×	×	0?
24 Std. . . .	×	×	×	×	×	×	×	×	×	0?

Aus der oberen Reihe ergibt sich, daß das Fällungsoptimum agglutininbeladener Bacillen $> 6 \cdot 10^{-8}$, aus der unteren, daß es $< 1 \cdot 10^{-6}$ ist.

Es ergibt sich hieraus, daß bei dem hier gewählten Mengenverhältnis von Agglutinin und Typhusbacillen das Optimum der Agglutination zwischen etwa $6 \cdot 10^{-8}$ und $1 \cdot 10^{-6}$ liegt.

Zusammenfassend können wir über die Agglutinine folgendes sagen:

Bei Anwesenheit etwas reichlicher Mengen von Agglutinin werden die Bacillen bei neutraler, saurer und alkalischer Reaktion gleich gut agglutiniert. Geht man aber mit der Agglutininmenge immer weiter bis an die eben noch wirksamen Mengen herunter, so tritt die Abhängigkeit der Agglutination von der [H˙] deutlicher, wenn auch nicht immer sehr scharf definierbar, hervor, und zwar liegt die Zone der Agglutination dann ungefähr bei neutraler Reaktion.

II. Versuche mit Eiweißpräcipitinen.

Als Antigen wurde Hammelserum, als Präcipitin das Serum eines mit Hammelserum vorbehandelten Kaninchens benutzt.

Das durch Injektion von Hammelserum erhältliche Präcipitin reagiert, wie aus meinen früheren Arbeiten hervorgeht, so gut wie ausschließlich mit dem Globulin des Hammelserums. Dieses ist daher als die eigentliche präcipitable Substanz aufzufassen. Ihr isoelektrischer Punkt liegt, wie früher festgestellt wurde, bei $3{,}6 \cdot 10^{-6}$.

Der isoelektrische Punkt des Präcipitins wurde nicht durch Überführungsversuche festgestellt, weil es große Schwierigkeiten macht, das in die Seitengefäße des Überführungsapparates hineingewanderte, sehr verdünnte Präcipitin nachzuweisen. Denn der Nachweis eines stark verdünnten Präcipitins ist viel schwieriger als der eines Bakterienagglutinins. Bei dem engen Zusammenhang des Präcipitins mit dem Globulin des Präcipitinserums (gleiche Aussalzbarkeit durch Ammonsulfat) in Verbindung mit dem Nachweis, daß das Typhusagglutinin mit dem Globulin des Serums den isoelektrischen Punkt gemeinsam hat, können wir es wenigstens als wahrscheinlich hinstellen, daß auch der isoelektrische Punkt des Präcipitins mit dem des Serumglobulins zusammenfällt. Wir hätten dann die auffällige Tatsache, daß

Tabelle IV.

	Röhrchen										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
$^{n}/_{10}$-Na-Acetat	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
$^{n}/_{100}$-Essigsäure	0,0	0,05	0,1	0,2	0,4	—	—	—	—	—	—
$^{n}/_{10}$- "	—	—	—	—	—	0,08	0,16	0,32	0,64	—	—
$^{n}/_{1}$- "	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,13	0,26
dest. Wasser	0,75	0,7	0,65	0,55	0,35	0,67	0,59	0,43	0,13	0,62	0,49
$[H^{\cdot}] =$	etwa 10^{-7}	$4 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-7}$	$1,6 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$2,6 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$

Dazu je 0,5 Präcipitin, im Verhältnis von 1 : p mit dest. Wasser verdünnt, und 0,5 Hammelserum, im Verhältnis von 1 : h mit dest. Wasser verdünnt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
p 10, h 25, Resultat	0	+	+	++	+++	+++	+++	0	0	0	0
p 20, h 1000	(+)	(+)	(+)	+	+	+	(+)	0	0	0	0
p 20, h 100	0	(+)	(+)	+	++	++	(+)	0	0	0	0
p 40, h 1000	0	0	(+)	+	(+)	+	0?	0	0	0	0
p 40, h 3000	(+)	(+)	(+)	(+)	+	++	+	0	0	0	0
p 50, h 50	0	(+)	++	++++	+++	++	0	0	0	0	0
p 50, h 100	0	(+)	++	+++	++	(+)	0	0	0	0	0
p 50, h 200	(+)	+	++	++	+	(+)	0	0	0	0	0
p 50, h 400	(+)	++	++	++	(+)	0?	0	0	0	0	0

Kontrolle.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
p 50, h ∞	0	0	0?	0?	(+)	0	0	0	0	0	0
p ∞, h 400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
p 20, h 1000	+	++	+(+)	+(+)	+	(+)	0	0	0	0	0
p 20, h 500	+	++	++	++	+	(+)	0	0	0	0	0
p 20, h 250	+	++	++	++	+	(+)	0	0	0	0	0
p 20, h 100	(+)	++	++	++	++	0?	0	0	0	0	0

Tabelle IV (Fortsetzung).

	Röhrchen										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Kontrolle: Hammelserum allein.										
p ∞ h 20	0	0	0	+	+	0?	0	0	0	0	0
p ∞ h 100	0	0	0	+	+	0?	0	0	0	0	0
p ∞ h 250	0	0	0	((+))	((+))	0	0	0	0	0	0
	Präcipitinserum allein.										
p 20 h ∞	0	((+))	+	+	+	((+))	0	0	0	0	0

Antigen und Antikörper in diesem Falle den gleichen isoelektrischen Punkt haben, und daraus allein würde schon hervorgehen, daß die Affinität der beiden zueinander nicht auf einer gegensätzlichen elektrischen Ladung beruhen kann. Die Versuche ergaben nun vorstehendes (Tab. IV).

Aus dieser Tabelle folgt, daß die Fällungsgrenzen des spezifischen Präcipitats bei Gegenwart kleiner Präcipitinmengen sich einigermaßen scharf bestimmen lassen. Sie liegen in der Regel zwischen $3 \cdot 10^{-6}$ und $6 \cdot 10^{-6}$, manchmal scheinbar der ersten, manchmal der zweiten dieser beiden Zahlen näher, jedenfalls aber stets so nahe an dem Fällungsoptimum des Serumglobulins ($4 \cdot 10^{-6}$), daß eine Verschiedenheit des Fällungsoptimums des spezifischen Präcipitats und des reinen Serumglobulins nicht erwiesen werden kann. Der Unterschied ist nur der, daß die gewöhnliche Globulinfällung von einer gewissen Verdünnung ab kaum mehr bemerkbar ist, während die spezifische Präcipitation bei der gleichen Verdünnung noch stark erkennbar ist. Die Erscheinungen sind also recht verschieden von denen des Typhus-Agglutinins.

In dieser Tabelle sind nur die Versuche mit hohen Präcipitinverdünnungen protokolliert. Über die Versuche mit stärker konzentriertem Präcipitin können wir zahlreiche Versuche in dem folgenden Satze zusammenfassen: Die Entstehung der spezifischen Fällungen ist **nicht** an genaue [H˙] geknüpft; sie entstehen in dem ganzen, durch

Phosphatmischungen erreichbaren Gebiete von [H˙] zwischen 10^{-5} und 10^{-9}, gleich gut.

III. Allgemeine Schlüsse.

Betrachten wir nun die Abhängigkeit dieser Fällungen, die aus der Vereinigung eines Antikörpers mit seinem Antigen hervorgehen, und vergleichen sie mit den Fällungen, die aus Nucleinsäure mit einem Eiweißkörper entstehen, so fällt sofort ein bedeutender Unterschied in die Augen. Während die Entstehung der Nucleinsäure-Albuminfällungen an eine geeignete Wasserstoffionenkonzentration der Lösung geknüpft ist, sind die spezifischen Fällungen in weitem Maße von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung unabhängig. Bei der Präcipitinreaktion macht es fast gar keinen Unterschied, ob die [H˙] der Lösung irgendwo zwischen 10^{-9} oder 10^{-5} liegt. Bei den Agglutininen ist, wenn wir mit einigermaßen größeren Agglutininmengen arbeiten, der Sachverhalt derselbe. Nur wenn wir mit der Agglutininmenge immer weiter heruntergehen, nahe an diejenigen Mengen, bei denen eine sichtbare agglutinierende Wirkung gerade überhaupt noch erkennbar ist, erkennen wir eine deutliche Abhängigkeit der Agglutination von der H˙-Konzentration der Lösung, und zwar ist das Optimum der Wirkung bei annähernd neutraler Reaktion. Sehr scharf bestimmbar ist es auch dann nicht; immer aber ist das Optimum der Agglutination von dem Optimum der unspezifischen Säureagglutination der Bakterien deutlich verschieden. Sehen wir aber von diesen quantitativ besonders ausprobierten Mengenverhältnissen ab, so können wir sagen, daß die spezifische Agglutination in recht weitem Maße unabhängig von der Acidität der Lösung ist. Das ist auch der Grund dafür, daß man die spezifischen Fällungen früher kennen lernte als die unspezifischen; während es zur Erzeugung der unspezifischen Fällungen sehr genau definierter H-Ionenkonzentrationen bedarf, wie sie mit der älteren Methodik kaum zu erhalten waren, war man bei den spezifischen Fällungen von diesem Faktor unabhängig. Das heißt aber: die spezifische Fällung ist von der elektrischen Ladung der beiden Komponenten in weitem Maße unabhängig. Während für die unspezifische Fällung die gegensätzliche Ladung zweier Kolloide geradezu als Ursache für ihre gegenseitige Fällung angesehen

werden kann, beruht die spezifische Fällung auf einer anderen Art der Affinität, die wir eben nicht anders als eine spezifisch-chemische bezeichnen können. Das Rätselhafte der spezifischen Reaktionen bleibt also durchaus bestehen, und wir können zu ihrer Erklärung noch nichts beitragen. Aber doch ist dieser sozusagen negative Befund sehr bedeutsam.

Er zeigt uns wiederum, daß die spezifische Affinität eine ganz besondere, rein chemische Ursache hat und daß die allgemeine Kolloidchemie zur Aufklärung der Spezifität nichts beitragen kann. Dies festzustellen, scheint uns bei der heutigen Zeitströmung von Bedeutung zu sein. Man hört heute oft: Die spezifischen Reaktionen sind Kolloidreaktionen; die Wassermannsche Reaktion ist eine Kolloiderscheinung u. dgl. Solche Behauptungen sind eigentlich recht banal. Denn da die miteinander reagierenden Stoffe Kolloide sind, so müssen ihre Reaktionen „Kolloidreaktionen" sein, ebenso wie, wenn zwei Gase miteinander unter Bildung eines neuen Gases reagieren, ihre Reaktion eine „Gasreaktion" sein muß. Alle Zustandsänderungen, die an einem Gase vor sich gehen können, beschränken sich auf Dilatation, Kompression, Kondensation, welche Ursache die Änderungen auch immer haben mögen. Und alle Zustandsänderungen, die in einer kolloidalen Lösung vor sich gehen können, bestehen in einer Vergröberung oder Verfeinerung der Dispersität, Lösung oder Fällung. Wenn man glaubt, das Wesen der spezifischen chemischen Affinität auf Kolloidreaktionen zurückführen zu können, so dürfte man sich auf falschem Wege befinden. Die Ursache, warum eine solche Auffassung zu dem heutigen Umfang anschwellen konnte, beruht auf der historischen Entwicklung der Dinge: viele allgemeine Kolloidreaktionen, und zwar besonders die Agglutination, lernte man zunächst in Form der biologisch spezifischen Agglutination durch Immunsera kennen, und erst viel später wurde es bekannt, daß die Agglutination an sich mit einem spezifischen Prozesse gar nichts zu tun hat, sondern daß es ebenso unspezifische wie spezifische Agglutinationen gibt, so wie es z. B. auch eine unspezifische wie eine fermentspezifische Hydrolyse des Rohrzuckers gibt. Wir benutzen deshalb die Gelegenheit, nochmals[1]) darauf hinzuweisen, daß zu solchen Versuchen der Erklärung der Spezifizität, wie sie etwa in der Seitenkettentheorie von P. Ehrlich vorliegen, die „kolloidchemische Theorie" in einen Gegensatz gar nicht treten kann, weil die letztere Theorie gar keinen Versuch zur Erklärung der Spezifizität darstellt, sondern nur die äußeren Phänomene der spezifischen Fällungen dem Verständnis nähergebracht hat, über die Ursachen der spezifischen Zustandsänderungen aber keinen Aufschluß gibt.

---

[1]) Vgl. L. Michaelis, Physik. Chemie der Kolloide, in Korányi-Richters Handbuch: Physikal. Chemie und Medizin; daselbst S. 452 „Das Wesen der spezifischen Affinität".

Zusammenfassung.

Die Entstehung „spezifischer“ Fällungen und Agglutinationen ist von der [H˙] der Lösung recht weitgehend unabhängig. Nur wenn die eine Komponente der reagierenden Stoffe in extremer Verdünnung im Vergleich zur anderen vorhanden ist, tritt der Einfluß der [H˙] deutlich hervor, aber bei weitem nicht so hervorragend wie bei den einfachen, unspezifischen Fällungen der einzelnen Kolloide. Eine Beziehung dieses Fällungsoptimums zu dem Fällungsoptimum bzw. isoelektrischen Punkte der Komponenten der spezifischen Verbindung ließ sich nicht erkennen. Für das Zustandekommen spezifischer Fällungen kann daher die elektrische Ladung der Komponenten nur eine untergeordnete Rolle spielen, vielmehr handelt es sich um spezifische c h e m i s c h e Affinitäten.

Die physikalische Natur bioelektrischer Potentialdifferenzen.

Von

Reinhard Beutner[1]).

(Aus dem Rockefeller Institute for Medical Research, New York.)

(Eingegangen am 26. August 1912.)

J. Loeb und der Verfasser haben vor kurzem in dieser Zeitschrift eine Abhandlung, betitelt: Über die Potentialdifferenzen an der unversehrten und verletzten Oberfläche tierischer und pflanzlicher Organe[2]), veröffentlicht. In den nachstehenden Zeilen möchte ich eine physikalische Erklärung der in der genannten Arbeit gewonnenen experimentellen Ergebnisse zu geben versuchen. Meine Theorie muß sich dabei, soweit sie quantitativ ist, auf die Potentialdifferenzen an der Grenzfläche unversehrter pflanzlicher Organe und wässeriger Lösungen beschränken; verletzte Flächen bieten deshalb komplizierte Verhältnisse, weil sie nicht homogen sind.

Der Sitz der bioelektrischen Potentialdifferenzen ist zweifellos an oder in den Membranen zu suchen, d. h. den nichtwässerigen Phasen des Gewebes, die die Zellen von angrenzenden wässerigen Flüssigkeiten trennen. Dies ist einerseits aus physikalischen Gründen von vornherein sehr wahrscheinlich und ergibt sich andererseits aus zahlreichen früheren Untersuchungen[3]). Jede Schnittfläche durch lebendes Gewebe stellt gewissermaßen ein Mosaik

[1]) Diese Abhandlung wurde dem 8. internationalen Kongreß für angewandte Chemie (Washington und New York, September 1912) vorgelegt. Der Verfasser.

[2]) Diese Zeitschr. 41, 1, 1912.

[3]) Eine Literaturzusammenstellung gibt Cremer in Nagels Handbuch der Physiologie.

dar, indem teilweise die Membranen, teilweise die wässerigen Flüssigkeiten, die innerhalb und außerhalb der Zellen sich befinden, zutage treten. Eine solche Schnittfläche bietet daher in Berührung mit wässerigen Lösungen komplizierte Phänomene; ebenfalls komplizierte Verhältnisse bietet die unverletzte tierische Haut, vielleicht auch zum Teil aus anderen Gründen. Die unverletzte Hülle pflanzlicher Organe dagegen kann als aus einer homogenen wasserunlöslichen Phase bestehend angesehen werden, die Potentialdifferenzen, die sich an derselben bei Berührung mit wässerigen Lösungen bilden, sind scharf definiert und momentan reversibel.

Experimentelle Tatsachen nach der früheren Arbeit.

Die experimentelle Untersuchung dieser Potentialdifferenzen, insbesondere ihre Abhängigkeit von der Zusammensetzung der wässerigen Lösung ist in der genannten Arbeit ausführlich beschrieben; sie verdient auch ein gewisses Interesse, denn diese Potentialdifferenzen sind wahrscheinlich gleicher oder ähnlicher Natur wie diejenigen an Membranen innerhalb des Gewebes überhaupt, die für elektrophysiologische Phänomene der verschiedensten Art verantwortlich, einer direkten physikalischen Untersuchung jedoch nicht zugänglich sind.

Ich möchte daher die untersuchten Potentialdifferenzen der Kürze halber als bioelektrische (abgekürzt b. P. D.) bezeichnen. Das für die folgende Untersuchung wichtigste Resultat der früheren Arbeit bezüglich derselben kann folgendermaßen zusammengefaßt werden:

Die b. P. D. (an der Grenze eines unverletzten Pflanzenteiles gegen die wässerige Lösung eines Alkali- oder Erdalkalisalzes) ist von der Konzentration der Lösung in der Weise abhängig, daß Verdünnung der Lösung dieselbe positiver macht. Alle Alkali- und Erdalkalisalze und auch alle anderen Elektrolyte zeigen ein solches Verhalten, soweit sie nicht stark giftig, d. h. chemisch verändernd auf die Oberfläche der Pflanze einwirken. Die Änderung der Potentialdifferenz ist in dem gleichen Sinne, diejenige an der Phasengrenze

Beliebiges Metall | Metallsalzlösung von wechselnder Konzentration.

Man kann also sagen, daß die b. P. D. für Kationen reversibel sind, und zwar in merkwürdigem Gegensatz

zu den bisher bekannten Potentialen für Kationen jeder Art. Die Größe der Änderung ist in einem gewissen Konzentrationsbereich beinahe so groß wie nach der Nernstschen Formel für Potentialdifferenzen $\left(E = \frac{RT}{nF} \ln C + \text{konst.}\right)$ zu erwarten ist. Geht man von kleinen Konzentrationen der Salzlösung, etwa $^1/_{1000}$ mol., aus und erhöht die Konzentration stufenweise in geometrischer Reihe, z. B. durch Verdoppelung, so findet man, daß die Veränderung der b. P. D. etwa 0,058 log 2 ist, bis die Konzentration auf etwa $^1/_{50}$ mol. gestiegen ist; über $^1/_{50}$ mol. wird die Änderung erheblich kleiner, ist die Konzentration auf $^1/_2$ bis $^1/_1$ mol. gestiegen, so hat weitere Erhöhung keinen Einfluß. Mit steigender Konzentration strebt also die b. P. D. einem Grenzwert zu.

Scheinbare Abweichung vom Nernstschen Gesetz bei kleinen Konzentrationen.

Erniedrigt man die Konzentration unter $^1/_{1000}$ mol., so findet man ebenfalls Abweichungen von der Nernstschen Formel. Diese Abweichungen sind indes nur scheinbar und dem Umstande zuzuschreiben, daß bei Konzentration von $^1/_{1000}$ bis $^1/_{100\,000}$ mol. die elektrolytischen Verunreinigungen des destillierten Wassers mit ins Spiel kommen. Das zu diesen Versuchen benutzte destillierte Wasser hatte schätzungsweise nach seiner Leitfähigkeit einen Ionen-Gehalt von $^1/_{10\,000}$ bis $^1/_{100\,000}$ mol. wechselnd. (Eine weitere sorgfältige Reinigung hatte keinen Zweck, da in Berührung mit der Blatt- oder Frucht-Oberfläche stets eine Erhöhung der Leitfähigkeit erfolgte.) Da bei den b. P. D. alle Elektrolyte in gleichem Sinne bei Konzentrationsänderung wirken, kann auch die Wirkung der verunreinigenden Ionen nicht vernächlässigt werden. Kontrolliert man durch Leitfähigkeitsbestimmungen die wahren Ionen-Konzentrationen, so findet man die Nernstsche Formel bis zu den höchsten Verdünnungen bestätigt, wie folgendes Beispiel zeigt.

Die Kette

Kalomel-Elektrode | $^1/_{10}$ n-KCl | Apfel | $^1/_{500}$-KCl | Kalomel-Elektrode

zeigte die EMK 0,064 Volt (2′ konstant). Wurde die $^1/_{500}$-KCl-Lösung durch eine $^1/_{1000}$ n-KCl-Lösung ersetzt, so war die EMK,

entsprechend der Änderung der b. P. D. bei *a* 0,082 Volt, Differenz: 0,018 Volt, nach Nernstscher Formel berechnet: 0,058 log 2 = 0,0175 Volt, also in vorzüglicher Übereinstimmung. Leitfähigkeitsbestimmungen ergaben, daß die Konzentration der Lösung durch Verunreinigungen nicht beeinflußt war. Wurde darauf die Konzentration der KCl-Lösung bei *a* durch 5fache Verdünnung auf $^1/_{5000}$ erniedrigt, so war die EMK: 0,110 Volt, Differenz gegen $^1/_{1000}$ n-KCl, 0,028 Volt, Nernsts Formel gibt 0,058 log 5 = 0,040 Volt. Diese Abweichung wird verständlich durch Messung der Leitfähigkeit der (scheinbar) $^1/_{5000}$ n-KCl-Lösung. K_{21° gemessen 0,0000378, berechnet nach Kohlrausch 0,0000258. Nimmt man an, daß die verunreinigenden Ionen bezüglich Wanderungsgeschwindigkeit sich wie das KCl verhalten, so wäre die wahre Konzentration der $^1/_{5000}$ n-KCl-Lösung $\frac{378}{258} \cdot \frac{1}{5000} = \frac{1}{2940}$, Differenzen der EMKe bei $^1/_{1000}$ und $^1/_{2940}$:

0,058 log 2,94 = 0,0272 Volt. Gefunden: 0,028 Volt.

Diese scheinbare Abweichung hat hiernach mit besonderen Eigentümlichkeiten der b. P. D. nichts zu tun, ist vielmehr nur ein anderer Ausdruck der Tatsache, daß alle Kationen die b. P. D. im gleichen Sinne beeinflussen. Anders liegt es bei den Abweichungen von der Nernstschen Formel bei hohen Konzentrationen. Diese können nicht etwa durch Zurückgehen der elektrolytischen Dissoziation bei hohen Konzentrationen erklärt werden. Der Grenzwert der b. P. D. wird bei einer Konzentration von $^1/_2$ mol. bis $^1/_1$ mol. erreicht, auch bei weiterer Konzentrationssteigerung muß aber die absolute Ionen-Konzentration offenbar trotz des Zurückgehens des Dissoziationsgrades steigen. Die Unveränderlichkeit der b. P. D. in diesem Gebiete zeigt, daß besondere Eigentümlichkeiten der Membran im Spiele sind.

Elektromotorisches Verhalten von Systemen mit zwei unmischbaren elektrolytischen Phasen.

Das Zustandekommen von Potentialdifferenzen, wie der b. P. D., kann physikalisch auf zwei verschiedenen Wegen erklärt werden. Auf jeden Fall ist es Voraussetzung, daß eine wasserunlösliche Phase (in diesem Falle die Schale oder Mem-

bran des Pflanzenteiles) neben wässeriger Lösung von Bedeutung ist. Es seien zunächst die allgemeinen physikalischen Tatsachen über das Zustandekommen von Potentialdifferenzen in Systemen mit zwei elektrolytischen Phasen besprochen.

Nernst hat zuerst das elektromotorische Verhalten von Systemen mit zwei unmischbaren Phasen experimentell und theoretisch untersucht. Gemeinsam mit Riesenfeld[1]) untersuchte er Anordnungen wie

Verdünnte wässerige Lösung eines beliebigen Salzes, z. B. $AgNO_3$	Phenol	Konzentrierte wässerige Lösung desselben Salzes ($AgNO_3$)

(Grenzflächen: 1 zwischen Lösung und Phenol, 2 zwischen Phenol und Lösung)

Zwei Arten von Potentialdifferenzen sind in diesen Ketten zu unterscheiden.

1. „Diffusionspotentiale" in Phenol. Diese kommen zustande, wenn die betreffenden Salze eine erhebliche Löslichkeit in Phenol besitzen, so daß die Stromleitung durch die Phenolschicht vermittels der gelösten Salze, resp. deren Ionen, vor sich geht. Unmittelbar an den Phasengrenzen 1 und 2 besteht nun Verteilungsgleichgewicht, das Phenol enthält bei 1 eine kleine, bei 2 eine große Konzentration an $AgNO_3$. In der Phenolschicht besteht also ein Konzentrationsabfall, die Änderung des Potentials längs desselben ist bekanntlich gegeben durch die Funktion:

$$\frac{u - v}{u + v} \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_2}{c_1}.$$

In wässerigen Lösungen sind u und v meist ungefähr gleich groß und deshalb die Diffusionspotentiale stets klein, in dem Phenol liegen ähnliche Verhältnisse vor. Nimmt man jedoch an, daß in manchen nicht wässerigen Phasen, wie z. B. den Membranen, erhebliche Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit der positiven und negativen Ionen bestehen, so könnte diejenige Art von Abhängigkeit der b. P. D. von Konzentrationen, wie sie hier beschrieben ist, auftreten. Ist z. B. v in der Membran gleich Null, so wäre das Diffusionspotential

$$= \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_2}{c_1}.$$

[1]) Nernst und Riesenfeld, Annal. d. Physik 8, 600 und 609.

Ich möchte jedoch diese Deutung aus folgenden Gründen für nicht sehr wahrscheinlich halten.

Die Erklärung setzt voraus, daß die Stromleitung durch die zweite Phase (Membran) ausschließlich durch die Salze, die aus der wässerigen Lösung in die Membran eintreten, vor sich geht. Nun sind, wie sich aus osmotischen Versuchen ergibt, die Membranen sehr schwer durchgängig für Salze. Nur äußerst geringe Salzspuren dringen also in die Membranen selbst unter den günstigsten Bedingungen, d. h. wenn die Salzlösung am konzentriertesten ist, ein. Die geringe Leitfähigkeit müßte durch diese Salzspuren bedingt sein und würde auf Null zurückgehen, wenn die Membran nur mit Wasser umspült ist. Dies ist im hohen Grade unwahrscheinlich, denn die Membran besitzt wahrscheinlich einen sehr geringen Gehalt an elektrolytischen Ionen, die unabhängig von den eingedrungenen ist, und da die Konzentration der letzteren sehr gering ist, **nicht** neben ihnen vernachlässigt werden kann.

Mit dieser Annahme ist es ferner kaum verständlich, weshalb die b. P. D. bei hoher Konzentration einem Maximum zustreben. Man sollte vielmehr das Umgekehrte erwarten, nämlich daß bei niedriger Konzentration ein Minimum besteht; die folgenden Überlegungen mögen dies näher erläutern.

Enthält die Membran keine anderen Elektrolyten als nur diejenigen, die durch Verteilungsgleichgewicht aus der wässerigen Lösung eingedrungen sind, so hätte die Kette

Konzentrierte wässerige Lösung Konz. c_1	Membran	Verdünnte wässerige Lösung Konz. c_2

stets die EMK $\frac{u-v}{u+v}\frac{RT}{nF}\ln\frac{c_1}{c_2}$, welchen Wert c_1 oder c_2 auch annehmen; dies entspricht jedoch nicht den Tatsachen, da, wie gesagt, die EMK einem Maximum zustrebt.

Nimmt man nun an, daß die Membran eine geringe Menge eines in Wasser unlöslichen Elektrolyten enthält, so ist es offenbar von Bedeutung, ob dessen Konzentration neben der Konzentration der Elektrolyte, die auf beiden Seiten aus der wässerigen Lösung eindringen, vernachlässigt werden kann oder ob umgekehrt diese letztere Konzentration zu vernachlässigen

ist. Bei einem bestimmt definierten Elektrolyt-Eigengehalt der Membran sei c_1 und c_2 relativ hoch; dann dringt auch aus den wässerigen Lösungen viel Elektrolyt in die Membran, und zwar so viel, nehmen wir an, daß der Elektrolyt-Eigengehalt daneben vernachlässigt werden kann; das Verhältnis der Elektrolyt-Konzentrationen in der linken und der rechten Grenzfläche der Membran (obige Kette) ist dann gleich $c_1 : c_2$ (nach dem Verteilungssatz, da in den Grenzflächen Gleichgewicht herrscht); die EMK obiger Kette also $\frac{u-v}{u+v}\frac{RT}{nF}\ln\frac{c_1}{c_2}$. Sind dagegen c_1 und c_2 sehr klein gewählt, dringt also sehr wenig Elektrolyt aus der wässerigen Lösung in die Membran, so kann umgekehrt die eingedrungene Elektrolytmenge vernachlässigt werden, es befindet sich dann überhaupt kein elektromotorisch wirksames Konzentrationsgefälle in der Membran; die EMK der obigen Kette ist also Null. In einem Gebiete mittlerer Konzentration muß die EMK offenbar allmählich absinken; die Gesetzmäßigkeiten, nach denen das geschieht, wären äußerst schwierig zu erforschen; diese Untersuchung ist aber auch unnötig, da, wie gesagt, die Tatsachen alle eben gemachten Folgerungen widerlegen: nicht bei großen, sondern bei kleinen Werten von c_1 resp. c_2 ist die Änderung der EMK am größten.

Diffusionspotentiale können die b. P. D. also wohl nur in zweiter Linie beeinflussen; eine ausschließliche Erklärung erscheint auf dieser Basis unmöglich; es müßten weitere komplizierte Hilfsannahmen zu diesem Zweck gemacht werden, dabei hat die Annahme extrem differenzierter Ionen-Wanderungsgeschwindigkeiten schon an und für sich einen stark hypothetischen Charakter. Ich glaubte diese Erklärungsmöglichkeit hier nur deshalb diskutieren zu müssen, da physiologische Forscher den Verletzungsstrom auf diese Art zu erklären versucht haben. Auch diesen Theorien ist eine gewisse Unsicherheit kaum abzusprechen.

Die andere Art von Potentialdifferenzen, die in der Nernst-Riesenfeldschen Kette möglich ist, hat ihren Sitz an der Phasengrenze selbst.

Nernst[1]) selbst hat vor längerer Zeit gezeigt, daß Phasengrenzpotentiale zwischen elektrolytischen Leitern in derselben

[1]) Nernst, Zeitschr. f. physikal. Chem. 9, 137, 1892.

Weise wie Potentiale an Metall-Elektrolytgrenzen von der Ionen-Konzentration abhängig sind, $= \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_1}{c_2} +$ konst., wo c_1 und c_2 Konzentrationen eines beliebigen beiden Phasen gemeinsamen Ion sind. Diese für die Elektrochemie fundamentale Tatsache beweist man am besten mit Hilfe einer fiktiven Kette wie

Metall	Phase I Salz des Metalles enthaltend	Phase II Salz des Metalles enthaltend	Metall
1	2	3	

Die Phase I und II sowie das Metall befinden sich im Gleichgewicht, und somit ist irgendeine chemische (oder physikalische) Reaktion in einer solchen Anordnung nicht möglich, auch nicht beim Stromfluß durch das System. Die Summe der 3 Potentialdifferenzen bei 1, 2 und 3 muß somit gleich Null sein.

Da P. D. bei 1 $= \frac{RT}{nF} \ln c_1 + \text{konst}_1$

und P. D bei 3 $= \frac{RT}{nF} \ln c_2 + \text{konst}_2$ in entgegengesetzter Richtung, so ergibt sich

für P. D. bei 2 $= \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_1}{c_2} + \text{konst}_1 - \text{konst}_2$.

In einer Kette wie der Nernst-Riesenfeldschen kommt diese Abhängigkeit des Phasengrenzpotentiales von der Konzentration nicht zum Vorschein, weil $AgNO_3$ in Wasser und Phenol löslich ist und das Phenol keinen weiteren Elektrolyten enthält.

Für das Dissoziationsgleichgewicht im Wasser gilt:

$$c_{Ag} \cdot c_{NO_3} = K_1 c^n_{AgNO_3}.$$

Für das Dissoziationsgleichgewicht im Phenol gilt:

$$C_{Ag} \cdot C_{NO_3} = K_2 C^n_{AgNO_3}.$$

Nach dem Verteilungssatz gilt, da an der Phasengrenze selbst stets Gleichgewicht herrschen muß,

$$\frac{c_{AgNO_3}}{C_{AgNO_3}} = K_3.$$

Division der beiden ersten Gleichungen gibt:

$$\frac{c_{Ag^{\cdot}}}{C_{Ag^{\cdot}}} \cdot \frac{c_{NO_3{}'}}{C_{NO_3{}'}} = \frac{K_1}{K_2} \cdot K_3 = K.$$

Da $$c_{Ag^{\cdot}} = c_{NO_3{}'} \text{ und } C_{Ag^{\cdot}} = C_{NO_3{}'},$$

$$\frac{c^2_{Ag^{\cdot}}}{C^2_{Ag^{\cdot}}} = K, \qquad \frac{c_{Ag^{\cdot}}}{C_{Ag^{\cdot}}} = \sqrt{K}.$$

Das Phasengrenzpotential ist also $\frac{RT}{nF} \ln \sqrt{K} + \text{konst.}$, d. h. von der $Ag^{\cdot}$-Konzentration unabhängig. Eine Konzentrationserhöhung im Wasser bringt eben eine solche im Phenol mit sich, und das Verhältnis $\frac{c_{Ag}}{C_{Ag}}$, auf das es für die Potentialdifferenzen ankommt, bleibt unverändert. Dies ist auch der Fall, wenn der Elektolyt in der einen Phase weitgehender als in der anderen dissoziiert ist, vorausgesetzt, daß das Verteilungsgesetz in der hier angewandten einfachen Form gilt. Anders verhält es sich, wenn die Ionenkonzentrationen der beiden aneinandergrenzenden Phasen sich nicht gegenseitig beeinflussen. Dies ist z. B. der Fall in der von Haber[1]) zuerst untersuchten Potentialdifferenz:

AgCl fest | $AgNO_3$-Lösung

oder allgemein

Unlösliches Salz | Lösung eines Salzes mit einem gleichen Ion.

Die $Ag^{\cdot}$-Konzentration in der Schicht des festen AgCl ist natürlich völlig unabhängig von der $Ag^{\cdot}$-Konzentration der wässerigen Lösung. Nach der Nernstschen Formel ist die Potentialdifferenz gleich zu setzen:

$$\frac{RT}{F} \ln \frac{c_{Ag^{\cdot}} \text{ im festen } Ag^{\cdot}}{c_{Ag^{\cdot}} \text{ in der wässerigen Lösung}} + \text{konst.}$$

Da $c_{Ag^{\cdot}}$ im AgCl konstant bleibt, folgt somit, daß diese Potentialdifferenz sich wie eine solche von einer metallischen (Ag) Elektrode ändert, was sich experimentell bestätigen ließ. Die Phasengrenzformel ist so einer direkten Prüfung zugänglich.

---

[1]) Haber, Annal. d. Physik [4] 26, 947, 1908. An dieser Arbeit ist der Verf. dieser Arbeit ebenfalls beteiligt.

Anwendung der physikalischen Ergebnisse auf die b. P. D.

Die b. P. D. verhalten sich nun im Gebiete der kleinsten Konzentrationen $^{n}/_{100}$ und weniger wie die Phasengrenzpotentiale vom Typus AgCl | Ag˙-haltige wässerige Lösung, im höchsten Konzentrationsgebiet (ca. $^{n}/_{2}$ oder mehr) wie die Phasengrenzpotentiale der Nernst-Riesenfeldschen Kette. Das dazwischen liegende mittlere Konzentrationsgebiet verhält sich wie eine Übergangszone zwischen diesen beiden Extremen.

Eine befriedigende Erklärung dieses Verhaltens gelingt mit Hilfe der Annahme, daß die Membran einen Eigengehalt an Elektrolyten besitzt, d. h. wasserunlösliches Salz in homogener Mischung enthält. Ferner nehmen wir an, daß die Alkalisalze in der Membran eine kleine, aber endliche Löslichkeit besitzen.

Es sei das wasserunlösliche Salz in der Membran mit YX bezeichnet (Y˙ Anion, X′ Kation), die wässerige Lösung enthalte KCl als Elektrolyt. Ferner müssen wir annehmen, daß YX mit dem in die Membran eingedrungenen KCl nach einer vollständig verlaufenen Gleichung reagiert, etwa so, daß elektrolytisch dissoziiertes KX und undissoziiertes YCl entsteht:

$$YX + KCl \rightarrow \underset{\text{weitgehend dissoziert}}{KX} + \underset{\text{wenig dissoziiert}}{YCl}$$

oder im Wasser leicht löslich, so daß es aus der Membran ausgelaugt wird.

Oder es könnte folgender Umsatz stattfinden:

$$YX + KCl \rightarrow YXClK.$$

Diese Additionsverbindung sei in die elektrolytischen Ionen Y X Cl′ einerseits, K˙ andererseits dissoziiert (also in derselben Weise wie Platinchloriddoppelsalze). Beide Annahmen sind für unseren Zweck gleichwertig; sie sind geboten angesichts der Tatsache, daß die Reversibilität der b. P. D. gegenüber allen Kationen besteht.

Diese Annahme vom Umsatz gewisser Bestandteile des Gewebes mit Salzen in wässeriger Lösung ist übrigens durchaus nicht völlig neu, vielmehr in ähnlicher Weise auf Grund ganz anderer Beobachtungen vor langer Zeit schon von J. Loeb ausgesprochen worden. Loeb beobachtete, daß die Reizbarkeit sowie die rhythmische Bewegung von Muskeln in gemischten Salz-

lösungen eine reversible, von der Natur des Kations abhängige Änderung erfuhr; z. B. hebt Zusatz von sehr geringen Mengen von Ca zu Na-Lösungen die rhythmischen Bewegungen auf, ähnliche reversible Wirkungen lassen sich mit Anionen nicht beobachten. Loeb[1]) „stellte sich deshalb vor, daß die Metalle oder Metallverbindungen in den Geweben mit bestimmten organischen Stoffen, wie festen Säuren oder Eiweißkörpern, verbunden sind, und daß die Substitution eines Metalles für ein anderes die physikalischen Eigenschaften dieser Verbindungen ändert, z. B. die Oberflächenspannung, die Viscosität, das Wasserabsorptionsvermögen und den Aggregatzustand. Die Lebenserscheinungen und die Erscheinungen der Reizbarkeit hängen davon ab, daß gewisse Eiweißverbindungen oder Metallseifen in bestimmten Verhältnissen in den Geweben vorhanden sein müssen". Diese Annahme wird durch die Resultate der vorliegenden Arbeit vollauf bestätigt, obgleich dieselben auf einem wesentlich anderen Gebiete liegen.

Ferner ist folgende für die Theorie vereinfachende Schlußfolgerung geboten. Bei genügend verdünnter Lösung ist, wie wir gesehen haben, die Nernstsche Formel für b. P. D. innerhalb eines weiten Konzentrationsgebietes in der gleichen Weise wie für Elektrodenpotentialdifferenzen gültig, nämlich

$$\text{b. P. D.} = \frac{RT}{nF} \ln c_{\text{wässr. Lösung}} + \text{konst.}$$

Dies ist mit der gemachten Annahme nur dann zu vereinigen, wenn der Umsatz nach irgendeinem der genannten Schema vollständig vor sich geht, das heißt von der Konzentration des Salzes in der wässerigen Lösung im wesentlichen unabhängig ist.

Nach dem Verteilungssatz ist andererseits die Konzentration des KCl in der Membran von der wässerigen KCl-Konzentration abhängig, und wir nehmen an, daß das Verteilungsgesetz in der einfachsten Form gilt, daß also Proportionalität der wässerigen und der Membrankonzentration besteht. Bei kleinen wässerigen Konzentrationen ist die KCl-Konzentration in der Membran so klein, daß sie neben der $K^{\cdot}$-Konzentration, die durch den Elektrolyteigengehalt der Membran bedingt ist,

[1]) Loeb, Dynamik der Lebenserscheinungen. S. 120.

vernachlässigt werden kann. Offenbar ist hiermit die Bedingung einer Veränderlichkeit der b. P. D. nach der Art der Potentialdifferenz AgCl | Ag-Lösung gegeben. Bei den höchsten wässerigen Konzentrationen dagegen steigt die KCl-Konzentration der Membran so weit, daß nunmehr umgekehrt der $K^{\cdot}$-Eigengehalt der Membran vernachlässigt werden kann; das würde offenbar also eine Veränderlichkeit der b. P. D. nach Art der Potentialdifferenz $AgNO_3$ in Phenol | $AgNO_3$ in Wasser zur Folge haben, wie es auch tatsächlich beobachtet wird.

Analytische Formulierung der beschriebenen Hypothese.

Zur Darstellung der gegenseitigen Abhängigkeit der Ionenkonzentrationen in Membran und wässeriger Lösung benutzen wir die üblichen Vorstellungen der elektrolytischen Dissoziation und des beweglichen Gleichgewichtes.

Membran	Wasser	
$KX = K^{\cdot} + X'$ $KCl = K^{\cdot} + Cl'$	$KCl = K^{\cdot} + Cl'$	c bezeichne Konzentrationen in wässeriger Lösung C Konzentrationen in der Membran.

Wir nehmen an, daß für die elektrolytische Dissoziation des KCl in Wasser und Membran das Massenwirkungsgesetz in der gleichen Weise angesetzt werden kann, nämlich:

$$c_{K^{\cdot}} \cdot c_{Cl'} = K_1 c_{KCl}^{n}\ [1]$$

in der wässerigen Lösung, also entsprechend

$$C_{K^{\cdot}} \cdot C_{Cl'} = K_2 C_{KCl}^{n}$$

in der Membran.

(Die Konstanten K_1 und K_2 sollen nicht gleich sein, wohl aber die Exponenten von c_{KCl} und C_{KCl}).

Das Verteilungsgesetz setzen wir an in der einfachen Form:

$$\frac{C_{KCl}}{c_{KCl}} = K_3.$$

Division der beiden ersten Gleichungen und Substitution mittels der dritten ergibt:

$$\frac{c_K}{C_K} = \frac{K_1}{K_2} \cdot \frac{1}{K_3} \frac{c_{Cl^{\cdot}}}{C_{Cl^{\cdot}}} = \frac{1}{K} \frac{c_{Cl'}}{C_{Cl}} \quad \ldots \ldots \quad 1)$$

Nach der Regel der Elektroneutralität ist

$$c_{K^{\cdot}} = c_{Cl'} = c \quad \ldots \ldots \quad 2)$$

$$C_{K^{\cdot}} = C_{Cl'} + C_{X'}$$

oder

$$C_{Cl'} = C_{K^{\cdot}} - C_{X'} \quad \ldots \ldots \quad 3)$$

---

[1]) Form des Massenwirkungsgesetzes für starke Elektrolyte nach van't Hoff und nach Rudolphi.

2 und 3, substituiert in 1, gibt:

$$\frac{c}{C_{K^\cdot}} = \frac{1}{K} \cdot \frac{C_{K^\cdot} - C_{X'}}{c}$$

$$C_K^2 - C_{X'} C_{K^\cdot} = K c^2$$

$$C_K = \frac{C_{X'}}{2} \pm \sqrt{\frac{C_{X'}^2}{4} + K c^2}.$$

Von den beiden Lösungen der quadratischen Gleichung hat nur diejenige mit positivem Vorzeichen vor der Wurzel einen physikalischen Sinn. Da nämlich K sowohl als auch c^2 nie einen negativen Wert annehmen können, muß der Wert der Wurzel notwendigerweise größer als $\frac{C_X}{2}$ sein; bei negativem Vorzeichen würde dies bedeuten, daß $C_{K^\cdot}$, eine Konzentration, negativ ist, eine physikalische Unmöglichkeit!

Es ist also

$$C_{K^\cdot} = \frac{C_X^2}{2} + \sqrt{\frac{C_{X'}}{4} + K c^2} \quad \ldots \ldots \quad 4)$$

Nach der zitierten Nernstschen Formel ist die

$$\text{b. P. D.} = \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_K}{c_K} + \text{konst. oder } \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_K}{c} + \text{konst.}$$

Substituiert man für $C_{K^\cdot}$ den Wert aus 4, so ergibt sich:

$$\text{b. P. D.} = \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{X'}}{2c} + \sqrt{\frac{C_{X^\cdot}^2}{4c^2} + K} + \text{konst.} \quad \ldots \quad 5)$$

Halten wir an unserer Annahme fest, daß die elektrolytische Dissoziation in der Membran ähnlich der in Wasser ist, so kann C_X in erster Annäherung als unabhängig von c (wäss. Konz.) angesehen werden. KX wäre dann nämlich weitgehend dissoziiert und die Zurückdrängung der Dissoziation durch überschüssiges KCl sehr gering; obgleich die KCl-Konzentration der Membran sich mit c ändert, bliebe die Dissoziation von KX doch unbeeinflußt, $C_{X^\cdot}$ also von c unabhängig.

Unter Berücksichtigung dieser Verhältnisse gibt die Gleichung 5 den charakteristischen Verlauf der b. P. D. gut wieder. Wir betrachten zunächst die Grenzbedingungen.

1. **Sehr kleine wässerige Konzentrationen.** Die Gültigkeit der Nernstschen Formel in der einfachsten Form kommt bei sehr kleinem c offenbar dadurch zustande, daß K neben $\left(\frac{C_X}{2c}\right)^2$ vernachlässigt werden kann. Gleichung 5 nimmt dann die Form an:

$$\text{b. P. D.} = \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_X}{c} + \text{konst.}$$

oder

$$= \frac{RF}{nF} \ln \frac{1}{c} + \text{konst.}',$$

d. h. die b. P. D. ändert sich mit c wie eine Elektrodenpotentialdifferenz.

2. Sehr große wässerige Konzentrationen. In diesem Falle kann umgekehrt $\left(\frac{C_x}{2c}\right)^2$ neben K vernachlässigt werden. Die Formel 5 nimmt die einfache Gestalt an:

$$\text{b. P. D.} = \frac{RT}{nF} \ln \sqrt{K} + \text{konst.},$$

d. h. bei höhen Konzentrationen ist die b. P. D. von c unabhängig.

Das Experimentum crucis für die Brauchbarkeit unserer Theorie bieten jedoch die mittleren Konzentrationen, denn offenbar können die Grenzbedingungen auch durch eine einfachere empirische Gleichung zum Ausdruck gebracht werden. Die Art und Weise, mit der die b. P. D. vom Grenzwert bei hohen Konzentrationen absinkt, wenn die Lösung stufenweise verdünnt wird, ist experimentell mit den Forderungen der Theorie zu vergleichen. Zwecks empirischer Prüfung der Gleichung 5 müssen die Konstanten C_x und K zunächst empirisch bestimmt werden. Eine einzige Bestimmung ist, wie die folgenden Ableitungen zeigen, hierfür genügend. Mathematisch am einfachsten ist es, als Differenz diejenige bei $C = {}^1/_{500}$ und der Grenz-EMK bei sehr großem c zu wählen. Es gilt dann bei Zimmertemperatur:

$$\underset{\text{(in Volt)}}{\text{b.P.D.}_{\text{bei } c = {}^1/_{500}}} = 0{,}058 \log \left(250\, C_x + \sqrt{250^2 C_x^2 + K}\right) + \text{konst.}$$

$$\text{b.P.D.}_{\text{limit}} = 0{,}058 \log \sqrt{K} + \text{konst.}$$

$$\text{Differenz: b.P.D.}_{c = {}^1/_{500}} - \text{b.P.D.}_{\text{limit}} = 0{,}058 \log \frac{250\, C_x + \sqrt{250^2 C_x^2 + K}}{\sqrt{K}}.$$

Diese Differenz setzen wir gleich 0,058 log 1/m, wo m also eine experimentell zu bestimmende Größe ist.

Es folgt

$$250\, C_x + \sqrt{250^2 C_x^2 + K} = \frac{1}{m} \sqrt{K}.$$

Auflösung dieser Gleichung nach $\sqrt{K}$ ergibt:

$$\sqrt{250^2\, C_x^2 + K} = \frac{1}{m} \sqrt{K} - 250\, C_x$$

quadriert:

$$250^2\, C_x^2 + K = \frac{1}{m^2} K - 500 \frac{1}{m} \sqrt{K} C_x + 250^2\, C_x^2,$$

mit $\sqrt{K}$ dividiert:

$$\sqrt{K} = \frac{1}{m^2} \sqrt{K} - 500 \frac{1}{m} C_x$$

$$-\sqrt{K} + \frac{1}{m^2} \sqrt{K} = 500 \frac{1}{m} C_x$$

$$\sqrt{K} = \frac{500\, C_x}{m\left(\frac{1}{m^2} - 1\right)}.$$

Berücksichtigt man, daß log 1/m gewöhnlich etwa gleich 2 ist, $\frac{1}{m^2}$ also ca. 10000, so kann statt $\frac{1}{m^2} - 1$ geschrieben werden $\frac{1}{m^2}$. Für $\sqrt{K}$ ergibt sich dann näherungsweise:

$$\sqrt{K} = 500\,m\,C_x.$$

Dieser Wert in Gl. 5 substituiert gibt für

$$\text{b. P. D.} = \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{C_x}{2c} + \sqrt{\frac{C_x^2}{4c^2} + 500^2 m^2 C_x^2} \right) + \text{konst.}$$

Die Differenz zweier beliebigen EMKe, die sich nur durch die Konzentrationen c_1 resp. c_2 an der Grenze der Membran unterscheiden, ist also

$$E_{c_1} - E_{c_2} = 0{,}058 \log \frac{\frac{C_x}{2c_1} + \sqrt{\frac{C_x^2}{4c_1^2} + 500^2 m^2 C_x^2}}{\frac{C_x}{2c_2} + \sqrt{\frac{C_x^2}{4c_2^2} + 500^2 m^2 C_x^2}}.$$
(in Volt)

Wie man sieht, hebt sich C_x aus dem Quotient hinter dem log heraus; wird der Quotient außerdem mit 2 erweitert, so ergibt sich

$$E_{c_1} - E_{c_2} = 0{,}058 \log \frac{\frac{1}{c_1} + \sqrt{\frac{1}{c_1^2} + 1000^2 m^2}}{\frac{1}{c_2} + \sqrt{\frac{1}{c_2^2} + 1000^2 m^2}}.$$

$$= 0{,}058 \log \frac{\frac{1}{c_1} \cdot (1 + \sqrt{1 + 10^6 m^2 c_1^2})}{\frac{1}{c_2} \cdot (1 + \sqrt{1 + 10^6 m^2 c_2^2})},$$

$$E_{c_1} - E_{c_2} = 0{,}058 \log \frac{c_2}{c_1} - 0{,}058 \log \frac{1 + \sqrt{1 + 10^6 m^2 c_2^2}}{1 + \sqrt{1 + 10^6 m^2 c_1^2}}$$

m war oben definiert durch die Beziehung

$$\log \frac{1}{m} = \frac{E_{c = 1/100} - E_{\text{limit}}}{0{,}058}.$$

Experimentelle Prüfung der Theorie.

Diese Formel gilt, wenn KCl als Elektrolyt zugegen ist oder auch bei irgend einem anderen binären einwertigen Elektrolyten. Für zweiwertige Elektrolyte wie $CaCl_2$ läßt die Theorie eine kompliziertere Beziehung voraussehen. Die ex-

perimentelle Prüfung geschieht durch Messung der EMK von Ketten wie

Kalomel-Elektrode	Apfel oder Blatt	Lösung variabler Zusammensetzung	Kalomel-Elektrode
	a	*b*	

In dieser Kette ist außer der b. P. D. bei *a* auch das Diffusionspotential bei *b* von der Konzentration der variablen Lösung abhängig. Ist KCl als Elektrolyt in der variablen Lösung sowie in der Kalomel-Elektrode (konstant $^1/_{10}$ n), so kann das Diffusionspotential bei *b* als unveränderlich angesehen werden, und es sind deshalb solche Versuche zur Prüfung der Theorie besonders geeignet.

1. Versuchsreihe beim Apfel. (KCl als Elektrolyte.)

Gemessen bei $c = \frac{1}{500}$ n-KCl: 0,0874 Volt

„ „ $c = \frac{1}{n}$ oder $\frac{1}{2}$ n-KCl: —0,0220 „

Dies kann als dem Grenzwert der b. P. D. entsprechend angesehen werden.

Es ist somit $\log \frac{1}{m} = \frac{0,1904}{0,058} = 1,8862,$

$$\log m^2 = -3,7724$$

$$10^6 m^2 = 169$$

$$\underset{\text{(in Millivolt)}}{E_{c_2} - E_{c_1}} = 58 \log \frac{c_2}{c} - 58 \log \frac{1 + \sqrt{1 + 169 c_2^2}}{1 + \sqrt{1 + 169 c_1^2}}.$$

Konzentrations-Intervall	Berechnet (Millivolt)	Beobachtet bei zunehmender Konzentration	Beobachtet bei abnehmender Konzentration	Mittel (Millivolt)
$^1/_1$ bis $^1/_2$	1,3	—	1,0	1,0
$^1/_2$ „ $^1/_4$	3,8	6,7	3,0	4,9
$^1/_4$ „ $^1/_8$	7,0	9,6	6,0	7,8
$^1/_8$ „ $^1/_{16}$	11,4	8,9	11,3	10,1
$^1/_{10}$ „ $^1/_{20}$	12,8	13,2	12,8	13,0
$^1/_{20}$ „ $^1/_{40}$	15,8	15,6	12,8	14,4
$^1/_{40}$ „ $^1/_{80}$	17,0	16,0	14,7	15,3
$^1/_2$ „ $^1/_{10}$	13,5	19,0	21,0	20,0
$^1/_4$ „ $^1/_{20}$	22,5	15,5	26,5	21,0
$^1/_8$ „ $^1/_{40}$	31,2	32,0	30,0	31,0
$^1/_{16}$ „ $^1/_{80}$	36,7	38,6	35,0	36,8

Wie man sieht, sind bei Änderung der Konzentration in entgegengesetzter Richtung die Änderungen der EMK nicht völlig gleich, besonders bei hohen Konzentrationen besteht diese Unsicherheit. Angesichts dieser mangelhaften Reversibilität kann die Übereinstimmung mit der Theorie als befriedigend angesehen werden, die Abweichungen der beobachteten Mittelwerte von den berechneten sind nur in einem Falle größer als 2 Millivolt (Intervall $^1/_2$ bis $^1/_{10}$), in den übrigen 10 Fällen kleiner. Eine größere Genauigkeit als 2 Millivolt kann bei solchen Messungen nicht erzielt werden. (Die Messung geschah n. b. mit einem empfindlichen Spiegelelektrometer.)

Eine weitere Versuchsreihe wurde an einem anderen Apfel mit KCl ausgeführt, wobei die Konzentrationsintervalle andere waren.

$$\text{Gemessen bei } c = \frac{1}{500}\,\text{KCl:} \quad 0{,}0750 \text{ Volt;}$$

$$\text{„ „ } c = \frac{1}{1}\,\text{KCl:} \quad -0{,}0294 \text{ „}$$

$$\text{Es ist somit } \log\frac{1}{m} = \frac{0{,}1046}{0{,}058} = 1{,}8034,$$

$$10^6 m^2 = 247{,}28.$$

Konzentrations-Intervall	Berechnet in Millivolt	Beobachtet in Millivolt
$^1/_{500}$ n bis $^1/_{250}$ n	17,5	17,0
$^1/_{250}$ n „ $^1/_{125}$ n	17,0	15,2
$^1/_{125}$ n „ $^1/_{25}$ n	38,5	36,3
$^1/_{50}$ n „ $^1/_{25}$ n	16,0	16,0
$^1/_{25}$ n „ $^1/_5$ n	23,5	27,1
$^1/_5$ n „ $^1/_1$ n	6,5	8,0
$^1/_1$ n „ $2\,^1/_2$ n	1,0	1,0 (in entgegengesetzter Richtung)

Auch bei diesen Versuchen ist die Übereinstimmung befriedigend.

Messungen der gleichen Art wie die eben beschriebenen mit dem Blatt einer Gummipflanze (Ficus elastica) sind in der genannten früheren Arbeit gegeben. Ich möchte auch für diese Messungen die hier abgeleitete Formel prüfen.

Konzentrations-Intervall	Beobachtet I	II	III	Mittel	Berechnet
$^1/_{1250}$ bis $^1/_{250}$	31	33	35	33	40,0
$^1/_{250}$ „ $^1/_{50}$	30	32	31	31	36,5
$^1/_{50}$ „ $^1/_{10}$	23	24	21	23	18,5

Zur Ausführung der Berechnung war die Kenntnis des Grenzwertes der Kraft, welcher bei noch höherer Konzentration erreicht wird, erforderlich. Er wurde in besonderen Versuchen gefunden:

Konzentrations-Intervall:		Die Berechnung ergab:
$^1/_{10}$n bis $^1/_2$n	5 Millivolt	4,5 Millivolt
$^1/_2$n „ $^5/_2$n	2 „	1 „

Was die Berechnung für diese Beispiele betrifft, so wurde hier so verfahren, daß die Größe m definiert wurde durch die Beziehung

$$\log \frac{1}{m} = \frac{E_{c = {}^1/_{250}} - E_{\text{limit}}}{0{,}058}.$$

Entsprechend lautet die Hauptformel:

$$\underset{\text{(in Millivolt)}}{E_{c_2} - E_{c_1}} = 58 \log \frac{c_2}{c_1} - 58 \log \frac{1 + \sqrt{1 + 500^2 m^2 c_2^2}}{1 + \sqrt{1 + 500^2 m^2 c_1^2}}.$$

In derselben Weise sind auch Versuche mit NaCl-Lösungen verschiedener Konzentration aus der früheren Arbeit durchgerechnet worden; hierbei ist jedoch zu beachten, daß in der entsprechenden Kette

Kalomel-Elektrode	Blatt des Gummibaumes	NaCl-Lösung welchseln-der Konzentration	Kalomel-Elektrode
	a		$\mp$ *b* + →

auch das Diffusionspotential bei *b* sich mit der Konzentration der variablen Lösung ändert. (Die Kalomel-Elektroden waren bei diesen Versuchen mit $^1/_{10}$ n-NaCl-Lösung gefüllt.) Nach einer bekannten Formel kann für Verfünffachung der Konzentration die Änderung des Diffusionspotentiales gleich $\frac{u-v}{u+v} \cdot 0{,}058 \log 5$ gesetzt werden, diese Größe kann für NaCl-Lösungen nicht so wie bei KCl vernachlässigt werden, da u

und v nicht völlig gleich sind; es ergibt sich vielmehr hierfür der Wert 0,008 Volt; die Änderung ist in dem Sinne, daß die variable Lösung mit steigender Verdünnung negativer gegen die Kalomel-Elektrode wird (da das negative Ion Cl eine größere Wanderungsgeschwindigkeit als das positive Na hat). Somit ist die Änderung in dem gleichen Sinne wie die Gesamtwirkung der Konzentrationsänderung: bei Verdünnung wird die rechte Seite der obigen Kette positiver, und es ist von der gemessenen Gesamtdifferenz bei Verfünffachung der Konzentration 0,008 Volt abzuziehen, um die Differenz der b. P. D. zu erhalten.

Zur Berechnung möchte ich die zweite NaCl-Versuchsreihe, die in der genannten Arbeit mitgeteilt ist, wählen, es war gefunden:

Konzentrations-intervall	Differenz gefunden	Nach Abzug des Differenzpotentials	Berechnet
$^1/_{1250}$ bis $^1/_{250}$	38	30	37,5
$^1/_{250}$ „ $^1/_{50}$	36	28	37,0
$^1/_{50}$ „ $^1/_{10}$	24	18	14,5

In einer anderen (nicht mitgeteilten) Versuchsreihe, für die das Konzentrationsintervall $^1/_{50}$ bis $^1/_{10}$ dieselbe Differenz der Kraft gab wie oben, ergab sich für

Konzentrations-intervall	Differenz gefunden	Nach Abzug des Differenzpotentials	Berechnet
$^1/_{10}$ bis $^1/_2$	13	5	3,5
$^1/_2$ „ $^5/_2$	11	3	1,0

Für die Berechnung wurde in diesem Falle gesetzt

$$\log \frac{1}{m} = \frac{0,052}{0,058} = 0,8966, \text{ also } 500^2 m^2 = 4025$$

$$E_{c_2} - E_{c_1} = 58 \log \frac{c_2}{c_1} - 58 \log \frac{1 + \sqrt{1 + 4025\, c_2^2}}{1 + \sqrt{1 + 4025\, c_1^2}}.$$

Die Übereinstimmung mit den theoretischen Werten ist bei diesen letzten Versuchen weniger gut als bei den ersten. Ich glaube das dadurch erklären zu können, daß diese letzten Versuchsreihen nicht an ein und demselben Objekt hintereinander durchgeführt wurden, somit von Unsicherheiten durch Ver-

schiedenheit des biologischen Materiales weniger frei sind. Die NaCl-Versuche sind außerdem mit den Unsicherheiten behaftet, die die Berechnung von Diffusionspotentialen mit sich bringt.

Zur richtigen Würdigung der vorliegenden Ergebnisse sei nochmals auf die Einzelannahmen hingewiesen, die zur Ableitung der Formeln nötig waren. Diese waren:

1. Gültigkeit des Verteilungssatzes (für Membran: Lösung) in der einfachsten Form.

2. Ähnlichkeit der elektrolytischen Dissoziation in Membran und wässeriger Lösung.

Ohne diese Annahmen steigen die mathematischen Schwierigkeiten alsbald zum fast Unüberwindbaren, und es scheint uns dann eben unmöglich, überhaupt zu quantitativen Beziehungen zu gelangen. Man wird zugeben, daß diese Hilfsannahmen ihrer Natur nach plausibel und in befriedigender Annäherung durch das Experiment bestätigt sind.

Beziehungen zu Nernsts Theorie der Reizung.

In der früheren mehrfach erwähnten Arbeit, die der Verfasser mit Jacques Loeb ausgeführt hat, wurde bereits gezeigt, daß die Potentialdifferenzen an der Schnittfläche pflanzlicher Gewebe qualitativ, aber nicht quantitativ sich ebenso verhalten wie solche an unverletzten Oberflächen; die Änderung der Potentialdifferenz mit der Konzentration der ableitenden Lösung erfolgt in demselben Sinne, jedoch in erheblich kleineren Beträgen. An der Hand der im Eingang dieser Arbeit gemachten Bemerkung, daß die Schnittfläche sich elektrisch wie ein Mosaik verhält, erscheint diese Beobachtung erklärlich. An der Grenze der durchschnittenen Membranteile wirkt die Konzentrationsänderung wie an der unverletzten Rinde, an denjenigen Stellen jedoch, wo ableitende Lösung und Saft zusammenkommen, ist kein Einfluß der Konzentration auf die Potentialdifferenz vorhanden. Es sind also in diesen Versuchen gewissermaßen zwei Ketten parallel geschaltet, solche mit wahren b. P. D. und solche mit Diffusionspotentialen; der Gesamteffekt muß also offenbar eine kleinere Konzentrationsveränderlichkeit als bei den b. P. D. sein, wie es auch tatsächlich beobachtet wird.

Möglich wäre es auch, die Erscheinungen an der Schnittfläche mit der Annahme zu deuten, daß die elektromotorisch wirksame Membran mit einer fest anhaftenden wässerigen Phase bedeckt ist, die Konzentration der ableitenden Flüssigkeit kann sich dann nur durch Diffusion durch diese Schicht hindurch bemerkbar machen.

Tierische Gewebe der verschiedensten Art verhalten sich ähnlich den verletzten Pflanzenteilen, wie auch schon in der früheren Arbeit gezeigt wurde. Ich möchte an dieser Stelle noch einmal auf die interessanten Versuche von Mc Donald[1]) und einen sich daraus ergebenden Zusammenhang mit der Nernstschen Theorie der Reizung hinweisen.

Mc Donald hat analoge Versuche mit Warmblüternerven ausgeführt, wie sie von Herrn Dr. Loeb und mir mit Pflanzenteilen beschrieben wurden. Freilich ist hiermit weder die von uns erreichte Präzision zu konstatieren, und es konnte deshalb auch nicht die hier gegebene physikalische Erklärung gewonnen werden. Die wässerige Lösung, die an der äußeren Oberfläche der Nerven haftet, wird durch Einlegen in Lösungen verschiedener Konzentration in ihrer Konzentration geändert, und damit die EMK, die man bei Ableiten von Oberfläche und Querschnitt mißt (gewöhnlich als Verletzungsstrom bezeichnet). Bekanntlich ist die Oberfläche positiv gegen den Querschnitt und sie wird um so positiver, je verdünnter die Spüllösung ist, in die der Nerv gelegt war und welche also an der Oberfläche haftet. Also selbst bei diesen Objekten wirkt die Konzentration in dem gleichen Sinne auf die b. P. D. Ist es hiernach nicht berechtigt, die Beziehung zwischen b. P. D., wie sie oben entwickelt wurde, als charakteristisch für Membranen verschiedenster Art anzusehen, wenigstens in gewisser Annäherung?

Mit zahlreichen elektro-physiologischen Erscheinungen müssen die b. P. D. offenbar im Zusammenhang stehen. Besonders interessant scheinen mir die Beziehungen zu der Nernstschen Theorie der Reizung. Die unter dieser Bezeichnung gewöhnlich zusammengefaßten Gesetzmäßigkeiten sind durch ein besonders solides Fundament von Tatsachen begründet. Nernst[2]) hat

---

[1]) Proc. Roy. Soc. 67, 310, 1900.

[2]) Sitzungsber. d. preuß. Akad. 1, 1, 1908. Siehe auch Arch. f. d. ges. Physiol. 122, 307, 1908.

gezeigt, daß die Erregung eines und desselben Muskels unter dem Einfluß von oszillatorischem oder alternierendem Stromfluß bei wechselnden elektrischen Bedingungen immer dann eintritt, wenn der Stromfluß (oder die Entladung) eine gewisse maximale Konzentrationsveränderung an Phasengrenzen zustande bringen kann. Zur Berechnung dieser Konzentrationsänderung (an der Phasengrenze zweier Elektrolyte) können dieselben Gesetzmäßigkeiten wie an einer Metallelektrode angenommen werden, z. B. als Funktion der Stromstärke und Wechselzahl eines Wechselstromes ist die Konzentrationsänderung gegeben als konst. $\frac{i}{\sqrt{m}}$, wo i die Stromstärke, m die Periodenzahl des Wechselstromes bedeutet. In der Tat zeigt sich, daß für alle Wechselströme, die gerade die Reizung eines und desselben Nervmuskelpräparates hervorrufen können, dieser Quotient konstant ist. — Wie wir gesehen haben, bedingen Konzentrationsänderungen Änderungen der Potentialdifferenz. Hiernach scheint es bei der Reizung auf eine gewisse maximale Polarisation an der Grenzfläche Membran | Lösung anzukommen. Daß diese Polarisation durch Vermittlung einer damit verknüpften Änderung der Oberflächenspannung in die Kette der Vorgänge eingreifen kann, soll hier nur angedeutet werden.

Bemerkenswert ist, daß der Elektrolytgehalt der meisten Körperflüssigkeiten konstant $^1/_8$ molekular ist. Ein Blick auf die Tabelle auf S. 88 zeigt, daß diese Konzentration für die b. P. D. insofern eine besondere Bedeutung hat, als Konzentrationssteigerung nur mehr eine sehr kleine Änderung hervorbringen kann, Konzentrationserniedrigung dagegen eine sehr viel größere. Dies scheint mir nach dem oben erklärten Zusammenhang zwischen Polarisation und Reizung mit der Tatsache verknüpft zu sein, daß gleiche Stromstöße in verschiedener Richtung sehr verschiedene Reizeffekte haben. Bekanntlich ist die Reizung bei Schließung eines Stromes sehr viel stärker an der Kathode als an der Anode, bei Öffnung umgekehrt. Die Konzentrationsverschiebungen in entgegengesetzten Richtungen bringen eben sehr verschiedene Änderungen der b. P. D. hervor. Übrigens würde dies auch der Fall sein, wenn für die b. P. D. eine einfache logarithmische Konzentrationsunabhängigkeit bestände, da der Stromstoß die Absolut-

werte der Konzentration nicht ihr Verhältnis ändert. Bei Gültigkeit meiner Formel ist die einseitige Wirkung der Konzentrationsänderung jedoch noch besonders ausgeprägt und am meisten für die Salzkonzentrationen, die in den Körpersäften vorkommen.

Eine andere Erscheinung, die vielleicht in demselben Zusammenhange eine Erklärung ist, ist die folgende. Overton[1]) erwähnt, daß die Reizbarkeit von Muskeln in hyperisotonischen Lösungen ($> {}^1/_8$ mol.) schneller verloren geht als in hypoisotonischen ($< {}^1/_8$ mol), obgleich in beiden Fällen schädigende Einflüsse sich bemerkbar machen. Die Tabelle auf S. 88 zeigt, daß bei Konzentrationen, die wesentlich höher als ${}^1/_8$ mol. sind, die b. P. D. sich nahezu in dem konzentrationsunabhängigen Gebiete befindet, es ist keine Polarisation möglich und damit der Erregungsvorgang gehemmt. Es soll indes nicht geleugnet werden, daß eine Konzentrationsänderung in diesen Fällen auch durch osmotische oder chemische Vorgänge Veränderungen im Gewebe hervorrufen kann, die ihrerseits die Reizbarkeit beeinflussen.

Hiermit scheinen mir zum ersten Male gewisse Anhaltspunkte gewonnen zu sein für das Verständnis der Tatsache, daß die Elektrolytkonzentration der Körpersäfte bei höheren Organismen konstant etwa ${}^1/_8$ g mol. sein muß.

Zusammenfassung.

Potentialdifferenzen an der Berührungsfläche:

Pflanzenteil | wässerige Lösung eines beliebigen Elektrolyten

ändern sich, wie Herr Dr. Loeb und der Verfasser gezeigt haben, reversibel mit der Konzentration der wässerigen Lösung in dem Sinne, daß steigende Verdünnung die Lösung positiver macht.

1. Zur Darstellung der Veränderlichkeit dieser Potentialdifferenz mit der Konzentration wird die Beziehung abgeleitet:

$$\text{Pot.-Diff. } 1 - \text{Pot.-Diff. } 2 = 58 \log \frac{c_1}{c_2} - 58 \log \frac{1 + \sqrt{1 + 10^6 m^2 c_1^2}}{1 + \sqrt{1 + 10^6 m^2 c_2^2}} \text{ Millivolt}$$

wo m durch die Beziehung gegeben ist:

$$\log \frac{1}{m} = \frac{\text{Grenzwert d. Pot.-Diff.} - \text{Pot.-Diff. für } c = {}^n/_{500}}{58}$$

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. 42, 346.

Der Ableitung dieser Formel liegt die Vorstellung zugrunde, daß ein vollständiger Umsatz zwischen einem Bestandteile der Membran und dem Elektrolyten der Lösung stattfindet, wobei ein wasserunlösliches Salz gebildet wird, das in der Membran in homogener Mischung enthalten ist (Eigengehalt der Membran). Außerdem sei der wässerige Elektrolyt infolge minimaler Löslichkeit als solcher in der Membran enthalten; für das Verhältnis der Konzentrationen Elektrolyt in Membran: Elektrolyt in Wasser wird das Verteilungsgesetz in der einfachsten Form angesetzt.

2. Die Formel läßt sich experimentell durch Messungen am Apfel gut bestätigen (siehe Tabellen S. 88 u. ff.). (Bei hohen Konzentrationen erreicht die Potentialdifferenz einen Grenzwert, bei kleinen Konzentrationen folgt sie einer einfachen logarithmischen Gesetzmäßigkeit; das Verhalten bei mittleren Konzentrationen kommt durch die Formel gut zum Ausdruck.)

3. Im Zusammenhang mit Nernsts Theorie der Reizung erklärt dieses Verhalten von bioelektrischen Potentialdifferenzen einige elektrophysiologische Beobachtungen, wenn man annimmt, daß die mit dem elektrolytischen Konzentrationsänderungen verknüpften Änderungen der Potentialdifferenz für die Erregung maßgebend sind. Die Beobachtungen sind: a) verschiedener Reizwert entgegengesetzt gerichteter, gleich starker Stromstöße, b) erregungshemmende Wirkung konzentrierter Salzlösungen. Bei dieser Erklärung ist noch die Annahme gemacht, daß die innerhalb der Gewebe befindlichen Membranen sich ähnlich den hier untersuchten verhalten; diese Annahme läßt sich durch gewisse Beobachtungen begründen.

Einfluß organischer Säuren auf die Hefegärung.

Von

Fritz Johannessohn.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 2. November 1912.)

Mit 1 Figur im Text.

Manfred Bial[1]) stellt in seiner Arbeit „Die antiseptische Funktion des H-Ions verdünnter Säuren" den Satz auf, daß bei der nötigen Verdünnung anorganische wie organische Säuren die Vergärung von Traubenzucker durch Hefe um so eher aufheben, je stärker dissoziiert die einzelnen Säuren sind.

So wirken die in geringen Konzentrationen völlig dissoziierten Säuren wie Schwefel-, Salpeter-, Trichloressig- und Salzsäure am stärksten und untereinander etwa gleich stark. Die mittelstark dissoziierten wie Oxal-, Ameisen- und Phosphorsäure brauchen zur Erzielung der gleichen Wirkung etwa 2 bis 3mal so starke Konzentrationen, und etwa 10mal stärker muß die Konzentration der schwach dissoziierten Säuren, wie Essig-, Propion- und Buttersäure sein. Bial konnte ferner zeigen, daß bei Zurückdrängung der Dissoziation durch Zusatz von einem Neutralsalz der betreffenden Säure die gärungshemmende Wirkung dieser Säure herabgesetzt wird. Da die Anionen sich in jenen geringen Konzentrationen völlig wirkungslos zeigten, glaubt Bial, dem dissoziierten H-Ion allein die gärungshemmende Wirkung zuschreiben zu müssen.

Andererseits haben Paul, Birstein und Reuß[2]) aus ihren Untersuchungen über die „Kinetik der Giftwirkung von gelösten Stoffen", die an Staphylokokken ausgeführt wurden, gefolgert, „daß nicht die H-Ionenkonzentration allein die ausschlaggebende Rolle bei der Desinfektions-

---

[1]) Manfred Bial, Die antiseptische Funktion des H-Ions verdünnter Säuren. Zeitschr. f. physikal. Chem. 40, 513, 1902.

[2]) Th. Paul, Birstein und Reuß, Beiträge zur Kinetik der Giftwirkung von gelösten Stoffen. Diese Zeitschr. 29, 202.

wirkung der Säuren spielt, und daß das Anion der Säuren sich be diesem Vorgang in erheblichem Maße beteiligt". Die Verfasser nehmen an, „daß die Anionen, ohne Desinfizientien zu sein, die Eigenschaft besitzen, die desinfizierende Wirkung des Wasserstoffions zu beschleunigen, d. h. sie besitzen die Eigenschaften von positiven Giftkatalysatoren". Das gilt für anorganische Säuren; für die von ihnen untersuchten organischen Säuren, nämlich Essig- und Normal-Buttersäure, folgern die eben genannten Forscher, daß „sowohl die Anionen, wie die undissoziierten Moleküle zur Erklärung dieser starken Giftwirkung herangezogen werden müssen".

Mit der letzten Folgerung stimmen die Beobachtungen E. Overtons[1]) überein, der für organische Säuren, die in Äther leicht löslich sind — und das sind die von Bial und Paul, Birstein und Reuß untersuchten organischen Säuren — gefunden hat, daß gerade die nicht dissoziierten Molekeln besonders leicht in Pflanzen- also auch in Hefezellen einzudringen vermögen, ja diese Zellen sind „für Ionen erst im beschädigten Zustande oder unter ganz besonderen Umständen durchlässig".

Es erschien daher nicht uninteressant, von neuem den Einfluß wenigstens einiger organischer Säuren auf die Hefetätigkeit zu untersuchen. Untersucht wurden Ameisensäure und ihre höheren Homologe, soweit diese in Wasser löslich sind, d. i. bis zur Isovaleriansäure. Diese Säuren sind in dieser Richtung bereits von Rosenblatt und Rozenband[2]) untersucht worden, die folgende Resultate erhielten: Die Alkoholgärung wird aufgehoben (bestimmt für 125 mg Saccharose und 100 mg Bieroberhefe-Preßhefe des Handels) durch

Ameisensäure	bei	11,500 g	pro Liter
Essigsäure	„	30,000 g	„ „
Propionsäure	„	269,000 g	„ „
n-Buttersäure	„	440,000 g	„ „
Isobuttersäure	„	264,000 g	„ „
Isovaleriansäure . . .	„	20,400 g	„ „

Ameisensäure, Essig-, Propion- und Buttersäure sind auch von M. Bial[3]) untersucht worden mit folgendem Ergebnis: die Alkohol-

[1]) E. Overton, Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie. Arch. f. d. ges. Physiol. 92, 115.

[2]) Rosenblatt et Rozenband, Sur l'influence paralysante exercée par certains acides sur la fermentation alcoolique. Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 149, Nr. 4, S. 309.

[3]) a. a. O.

gärung wird aufgehoben (bestimmt für 1,5 g Glucose und 0,25 g Hefe bei 60 ccm Gesamtflüssigkeit) von

Ameisensäure	bei 0,016 n
Essigsäure	„ 0,041 n
Propionsäure	„ 0,066 n
Buttersäure	„ 0,05 n

Für Ameisensäure haben ferner Lüterig und Sartori[1]) den Wert von 125 mg als gärungsaufhebend für 3,0 g Hefe bei 5% Zuckergehalt und 100 ccm Gesamtflüssigkeit gefunden.

Eine Vergleichung der einzelnen Ergebnisse, die nur unter Berücksichtigung gewisser Bedingungen möglich ist, soll später erfolgen.

Meine Versuchsanordnung gestaltete sich in Anlehnung an die von Lüterig und Sartori[1]) angewandte folgendermaßen:

Im 100 ccm-Meßkolben werden zu 25 ccm einer 10%igen Lösung gereinigten Traubenzuckers 25 ccm Säuremischung, bzw. destilliertes Wasser gefügt, darauf 1,5 g Hefe, und zwar gewöhnliche käufliche Preßhefe. Nach kräftigem Umschütteln bleibt das Gemisch verschieden lange, bis zu 23 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Dann werden 2,5 g Bleiessig hinzugesetzt, die in einem Kontrollversuch die Hefetätigkeit völlig aufhoben, und darauf mit destilliertem Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. Durch mitunter mehrmalige Filtration werden klare Lösungen erhalten, deren Zuckergehalt durch Polarisation im Lippichschen Halbschattenapparat festgestellt wird. In den mitzuteilenden Versuchen ist dann die vergorene Zuckermenge in Prozenten der ursprünglich vorhandenen Zuckermenge ausgedrückt worden. Dabei ist [α] als konstant angenommen worden; nach Landolt[2]) erreicht der dadurch entstehende Fehler im ungünstigsten Falle den Betrag von 0,03%, er spielt also bei unseren Resultaten gar keine Rolle.

Gärungsförderung durch geringe Säurekonzentrationen.

Hugo Schulz[3]) hat in seiner Arbeit „Zur Lehre von der Arzneiwirkung" die Behauptung aufgestellt, „daß jeder Reiz auf eine einzelne Zelle sowohl, wie auch auf die aus Zellgruppen bestehenden Organe entweder eine Vermehrung oder eine Verminderung ihrer physiologischen Leistungen bedinge, entsprechend der geringeren oder größeren Intensität des

[1]) H. Lüterig und A. Sartori, Gärungshemmungen zuckerhaltiger Lösungen durch Konservierungsmittel. Pharmazeutische Zentralhalle für Deutschland 1908.

[2]) Landolt, Das optische Drehungsvermögen.

[3]) H. Schulz, Zur Lehre von der Arzneiwirkung. Virchows Archiv 108, 427, 1877.

Reizes". In jener Arbeit hat H. Schulz über Versuche berichtet, die diese Behauptung für die tierische Zelle beweisen sollten. 1888 hat er[1]) dann die Richtigkeit dieses Satzes auch für die pflanzliche Zelle darzutun versucht. Er benutzte als pflanzliche Zelle die Hefe und als Stoffe, die in stärkerer Konzentration die Gärung völlig verhindern, in schwächerer dagegen fördern sollten, Jod, Sublimat, Brom, arsenige Säure, Chromsäure, Salicyl- und Ameisensäure. Für letztere hatte schon sein Schüler Hoffmann[2]) gefunden, daß eine Konzentration 1:10000 imstande ist, die Hefegärung zu verstärken; Schulz fand dieselbe Konzentration wirksam. Daß antiseptische Mittel überhaupt mitunter eine Steigerung der Hefetätigkeit verursachen können, hat schon Liebig 1870 (Über die Quelle der Gärung) bemerkt, und H. Schulz schreibt: „Es ist allerdings auch auf diesem Gebiete die Erfahrung dem Experimente bereits lange vorausgeeilt, und daß Zusätze von sonst gärungswidrigen Substanzen, wie z. B. Kupfersulfat oder Salicylsäure, unter Umständen die Hefe zu energischerer Tätigkeit veranlassen können, gewissen Gewerben nicht unbekannt."

Biernacki[3]) konnte auch bei anderen Desinfektionsmitteln diese gärungsfördernde Wirkung feststellen, und er behauptet: „Wenn ein Repräsentant einer antiseptischen Gruppe die Gärung beschleunigt, vermögen seine Analoga dasselbe zu verursachen." Danach war von vornherein anzunehmen, daß sämtliche von mir untersuchten Säuren die Fähigkeit zeigen würden, bei einer gewissen geringen Konzentration auf die Hefegärung fördernd einzuwirken. Ich habe hierbei meine Versuche, die im übrigen in der vorher geschilderten Weise angestellt waren, nach 2 Stunden unterbrochen, da nach dieser Zeit der Unterschied gegenüber dem Kontrollversuch am deutlichsten war; nach längerer Zeit verwischen sich die Unterschiede mehr und mehr.

Es zeigt sich in diesen Versuchen, daß bei allen untersuchten Säuren der aliphatischen Reihe stets die gleiche mole-

---

[1]) H. Schulz, Über Hefegifte. Arch. f. d. ges. Physiol. 42, 517.

[2]) G. Hoffmann, Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung der Ameisensäure. Greifswald 1884.

[3]) E. Biernacki, Über die Eigenschaft der Antiseptica, die Alkoholgärung zu beschleunigen. Arch. f. d. ges. Physiol. 49, 112.

Tabellarische Übersicht der Versuche.

Es wurden von der ursprünglichen Zuckermenge vergoren	Ameisen-	Essig-	Propion-	n-Butter-	Iso-butter-	Iso-valerian-
				Säure		
	%	%	%	%	%	%
Im Kontrollversuch ohne Säure . .	14,3	12,17	4,0	13,0	4,0	11,0
Bei Zusatz von 22 ccm $^{n}/_{100}$-Säure, d. h. in ca. $^{n}/_{200}$-Säure	13,0	8,7	4,8	6,0	2,0	9,0
Bei Zusatz von 13,0 ccm $^{n}/_{100}$-Säure, d. h. in ca. $^{n}/_{400}$-Säure	16,0	14,8	4,0	10,0	4,5	11,0
Bei Zusatz von 11,0 ccm $^{n}/_{100}$-Säure, d. h. in ca. $^{n}/_{450}$-Säure	20,5	20,9	8,0	18,0	10,0	17,0
Bei Zusatz von 9,0 ccm $^{n}/_{100}$-Säure, d. h. in ca. $^{n}/_{550}$-Säure	11,7	10,0	4,5	9,0	5,0	11,0

kulare Konzentration, nämlich 0,11 ccm n-Säure bei 50 ccm Gesamtflüssigkeit und 1,5 g Hefe am besten imstande ist, die Hefetätigkeit zu verstärken. Es entspricht die gesamte Versuchsflüssigkeit ungefähr einer $^{n}/_{450}$-Säure. In Gramm wasserfreier Substanz ausgedrückt betrug der Zusatz

für die Ameisensäure .	0,005 06 g,	die Konzentration also	1:10000
" " Essigsäure . .	0,0066 g,	" " "	1:7576
" " Propionsäure .	0,008 14 g,	" " "	1:6143
" " n-Buttersäure .	0,009 68 g,	" " "	1:5165
" " Isobuttersäure	0,009 68 g,	" " "	1:5165
" " Isovaleriansäure	0,011 22 g,	" " "	1:4456

Der von mir für die Ameisensäure ermittelte Wert stimmt mit dem von H. Schulz und Hoffmann überein. — Es zeigt sich nun, daß die günstigsten gärungsfördernden Konzentrationen der untersuchten Säuren zueinander im einfachen Verhältnis der Molekulargewichte der verwendeten Säuren stehen. So verhalten sich z. B. die Molekulargewichte von Ameisensäure zu Essigsäure wie 46:60 = 1:1,3, die betreffenden Säurezusätze wie 0,005 06:0,0066 oder auch wie 1:1,3. Auf die Frage, ob bei diesen Säurewirkungen die Dissoziation eine mehr oder weniger ausschlaggebende Rolle spiele, soll später im Zusammenhang eingegangen werden.

Gärungshemmung durch stärkere Säurekonzentrationen.

Schon bei manchen im vorhergehenden Abschnitt angewandten geringen Säurekonzentrationen war eine gewisse, wenn auch nicht allzu starke Hemmung der Hefetätigkeit dem Kontroll-

versuch gegenüber wahrzunehmen. Es galt nun, festzustellen, welche Konzentrationen zur vollständigen Aufhebung der Gärung erforderlich sind. In dieser Versuchsreihe hat die Dauer jedesmal 23 Stunden betragen. Ich lasse die Versuche nur in tabellarischer Übersicht folgen.

1. Ameisensäure.

Von der ursprünglichen Zuckermenge wurden vergoren	I %	II %	III %	IV %	V %
Im Kontrollversuch ohne Säure	87,0	78,7	78,7	83,0	81,3
Bei Zusatz von 0,4 ccm n-Säure, d. h. in einer $^{n}/_{140}$-Säure	—	57,3	—	—	—
" " " 0,6 " " " " " " $^{n}/_{90}$ "	—	19,6	—	—	21,0
" " " 0,7 " " " " " " $^{n}/_{72}$ "	—	—	0,0	—	11,7
" " " 0,8 " " " " " " $^{n}/_{62}$ "	—	0,0	—	7,8	4,8
" " " 0,9 " " " " " " $^{n}/_{55}$ "	—	—	—	—	0,0
" " " 1,0 " " " " " " $^{n}/_{50}$ "	0,0	—	—	0,0	0,0
" " " 2,0 " " " " " " $^{n}/_{25}$ "	0,0	—	—	—	—
" " " 3,0 " " " " " " $^{n}/_{17}$ "	0,0	—	—	—	—

Aus den angeführten Versuchen geht hervor, daß Ameisensäure im günstigsten Falle bei 0,7 ccm der n-Ameisensäure auf 50,0 ccm Flüssigkeit die Gärung völlig aufzuheben vermag. Das entspricht einem Zusatz von 0,0322 g reiner Ameisensäure, mithin der Konzentration 1 : 1553, oder einer $^{n}/_{72}$ oder 72 litrigen Säure. Allerdings zeigen auch die Versuche, daß manche Hefe widerstandsfähiger ist; doch habe ich bei Zusatz von 1,0 ccm n-Ameisensäure stets eine völlige Aufhebung der Gärung erhalten. Das entspricht dann einem Zusatz von 0,046 g reiner Säure, mithin der Konzentration 1 : 1087 oder einer $^{n}/_{50}$ oder 50 litrigen Säure.

2. Essigsäure.

Von der ursprünglichen Zuckermenge wurden vergoren	I %	II %	III %
Im Kontrollversuch ohne Säure	79,0	72,5	81,3
Bei Zusatz von 1,0 ccm n-Säure, d. h. in einer $^{n}/_{50}$-Säure	71,0	—	—
" " " 1,2 " " " " " " $^{n}/_{43}$ "	65,0	—	—
" " " 1,4 " " " " " " $^{n}/_{35}$ "	63,0	—	—
" " " 1,6 " " " " " " $^{n}/_{32}$ "	52,0	—	—
" " " 2,0 " " " " " " $^{n}/_{25}$ "	—	37,0	—
" " " 2,5 " " " " " " $^{n}/_{20}$ "	—	19,6	—
" " " 3,0 " " " " " " $^{n}/_{17}$ "	—	16,0	—
" " " 3,8 " " " " " " $^{n}/_{13}$ "	7,5	6,0	7,0
" " " 4,0 " " " " " " $^{n}/_{12.5}$ "	—	—	4,0
" " " 4,2 " " " " " " $^{n}/_{11.9}$ "	—	—	0,0
" " " 4,5 " " " " " " $^{n}/_{11}$ "	—	—	0,0

Wie aus diesen Versuchen hervorgeht, hebt im günstigsten Falle bei unserer Versuchsanordnung ein Zusatz von 4,2 ccm der n-Essigsäure die Hefetätigkeit völlig auf. In Versuchen mit anderer Hefe erwies sich diese Konzentration als nicht ausreichend; doch habe ich stets durch Zusatz von 4,5 ccm n-Säure eine vollständige Gärungshemmung erhalten. Das entspricht einem Zusatz von 0,252 g bis 0,270 g reiner Essigsäure, mithin der Konzentration 1 : 198 bzw. 1 : 185 oder einer $^n/_{11,9}$ bis $^n/_{11,0}$ oder einer 11,9 bis 11,0 litrigen Säure.

3. Propionsäure.

Von der ursprünglichen Zuckermenge wurden vergoren	I %	II %	III %
Im Kontrollversuch ohne Säure	83,75	73,0	72,0
Bei Zusatz von 2,0 ccm n-Säure, d. h. in einer $^n/_{25}$-Säure	29,1	—	—
„ „ „ 3,0 „ „ „ „ „ „ $^n/_{17}$ „	21,3	—	—
„ „ „ 4,0 „ „ „ „ „ „ $^n/_{12.5}$ „	12,6	—	—
„ „ „ 5,0 „ „ „ „ „ „ $^n/_{10}$ „	9,6	—	—
„ „ „ 5,2 „ „ „ „ „ „ $^n/_{9.5}$ „	—	—	2,7
„ „ „ 5,4 „ „ „ „ „ „ $^n/_{9.3}$ „	—	—	0,0
„ „ „ 5,6 „ „ „ „ „ „ $^n/_{8.9}$ „	—	—	0,0
„ „ „ 5,8 „ „ „ „ „ „ $^n/_{8.6}$ „	—	—	0,0
„ „ „ 6,0 „ „ „ „ „ „ $^n/_{8.3}$ „	—	0,0	—

Die mitgeteilten Versuche zeigen, daß im günstigsten Falle bei einem Zusatz von 5,4 ccm der Normal-Propionsäure die Hefe in ihrer Tätigkeit völlig gehemmt wird. Das entspricht einem Zusatz von 0,3996 g reiner Propionsäure, mithin der Konzentration 1 : 125 oder einer $^n/_{9,3}$ oder 9,26 litrigen Säure.

4. Buttersäure.

Von der ursprünglichen Zuckermenge wurden vergoren	I %	II %
Im Kontrollversuch ohne Säure	73,9	80,2
Bei Zusatz von 4,0 ccm n-Säure, d. h. in einer $^n/_{12.5}$-Säure	4,3	—
„ „ „ 4,2 „ „ „ „ „ „ $^n/_{11.9}$ „	—	5,5
„ „ „ 4,4 „ „ „ „ „ „ $^n/_{11.4}$ „	—	3,5
„ „ „ 4,6 „ „ „ „ „ „ $^n/_{10.9}$ „	—	0,0
„ „ „ 5,0 „ „ „ „ „ „ $^n/_{10}$ „	0,0	0,0
„ „ „ 6,0 „ „ „ „ „ „ $^n/_{8.3}$ „	0,0	—

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß bei unserer Versuchsanordnung ein Zusatz von 4,6 ccm Normal-Buttersäure imstande ist, die Gärung völlig aufzuheben. Es entspricht

dieser Zusatz 0,4048 g reiner Buttersäure, mithin der Konzentration 1 : 123,5 oder einer $^{n}/_{10,9}$ oder 10,9litrigen Säure.

5. Isobuttersäure.

Von der ursprünglichen Zuckermenge wurden vergoren	I %	II %	III %	IV %
Im Kontrollversuch ohne Säure	77,0	73,3	82,2	77,0
Bei Zusatz von 2,5 ccm n-Säure, d. h. in einer $^{n}/_{20}$-Säure	13,8	—	—	—
„ „ „ 3,0 „ „ „ „ „ $^{n}/_{17}$ „	8,0	—	—	—
„ „ „ 3,5 „ „ „ „ „ $^{n}/_{14}$ „	4,0	—	—	—
„ „ „ 3,8 „ „ „ „ „ $^{n}/_{13}$ „	2,3	—	—	—
„ „ „ 3,9 „ „ „ „ „ $^{n}/_{12,8}$ „	—	2,3	—	—
„ „ „ 4,0 „ „ „ „ „ $^{n}/_{12,5}$ „	—	1,8	—	—
„ „ „ 4,2 „ „ „ „ „ $^{n}/_{11,9}$ „	—	—	7,4	—
„ „ „ 4,4 „ „ „ „ „ $^{n}/_{11,4}$ „	—	—	2,3	2,3
„ „ „ 4,6 „ „ „ „ „ $^{n}/_{10,9}$ „	—	—	—	0,0
„ „ „ 4,8 „ „ „ „ „ $^{n}/_{10,4}$ „	—	—	—	0,0
„ „ „ 5,0 „ „ „ „ „ $^{n}/_{10}$ „	—	0,0	0,0	0,0

Nach diesen Versuchen hebt im günstigsten Falle ein Zusatz von 4,6 ccm Normal-Isobuttersäure die Gärung völlig auf. Das entspricht 0,4048 g reiner Isobuttersäure, mithin der Konzentration 1 : 123,5 oder einer $^{n}/_{10,9}$ oder 10,9litrigen Säure.

Meine Versuche zeigen ein fast vollständiges Übereinstimmen in der gärungshemmenden Kraft der beiden isomeren Buttersäuren, und jedenfalls war die die Gärung völlig aufhebende Konzentration bei beiden Säuren gleich, obwohl nicht dieselbe Hefe angewendet worden war. Ich habe schließlich gleiche Konzentrationen beider Säuren auf dieselbe Hefe einwirken lassen, wobei sich dann eine vollkommene Übereinstimmung in der gärungshemmenden Kraft beider Isomeren herausstellte, wie es die folgenden Versuche zeigen:

5a. Buttersäure und Isobuttersäure.

Von der ursprünglichen Zuckermenge wurden vergoren	I		II	
	Butter-	Iso-butter-	Butter-	Iso-butter-
	Säure		Säure	
	%	%	%	%
Im Kontrollversuch ohne Säure	82,2		70,0	
Bei Zusatz von 4,2 ccm n-Säure, d. h. in einer $^{n}/_{11,9}$-Säure	7,4	7,4	—	—
„ „ „ 4,4 „ „ „ „ „ $^{n}/_{11,4}$ „	4,35	4,35	2,4	2,4
„ „ „ 4,6 „ „ „ „ „ $^{n}/_{10,9}$ „	—	—	0,0	0,0
„ „ „ 4,8 „ „ „ „ „ $^{n}/_{10,4}$ „	—	—	0,0	0,0

6. Isovaleriansäure.

Von der ursprünglichen Zuckermenge wurden vergoren	I %	II %
Im Kontrollversuch ohne Säure	75,22	75,6
Bei Zusatz von 6,0 ccm $^4/_{10}$ n-Säure, d. h. in einer $^n/_{20,9}$-Säure	14,35	—
" " " 8,0 " " " " " $^n/_{15,6}$ "	2,14	3,6
" " " 9,0 " " " " " $^n/_{13,9}$ "	—	1,3
" " " 10,0 " " " " " $^n/_{12,5}$ "	0,0	0,0
" " " 12,0 " " " " " $^n/_{10,4}$ "	0,0	—

Bei den vorstehenden Versuchen wurde eine $^4/_{10}$ n-Säure als Zusatz benutzt, da die Wasserlöslichkeit der Isovaleriansäure zu gering ist, als daß sich eine n-Säure herstellen ließe. Umgerechnet auf n-Säure haben nach diesen Versuchen 4,0 ccm n-Säure in unserem Versuchsgemisch die Gärung völlig aufgehoben. Das entspricht einem Zusatz von 0,408 g reiner Isovaleriansäure, demnach der Konzentration 1 : 122,5 oder einer $^n/_{12,5}$ oder 12,5 litrigen Säure.

Es erhob sich nun im Anschluß an die eben mitgeteilten Bestimmungen der gärungsaufhebenden Konzentrationen die Frage:

Wird die Hefe durch die gärungsaufhebenden Konzentrationen abgetötet?

Meine Versuche zur Beantwortung dieser Frage gestalteten sich folgendermaßen: In der oben beschriebenen Weise werden je zwei Kolben mit derselben Säurekonzentration beschickt. Nach 23 Stunden wird der Inhalt des einen Kolbens in der bereits eingangs geschilderten Weise untersucht, während von dem Inhalte des anderen Hefe und Zucker-Säuremischung durch Zentrifugieren voneinander getrennt werden. Die Hefe wird dann noch mehrmals ausgewaschen und darauf mit je 25,0 ccm der 10 %igen Zuckerlösung und destillierten Wassers versetzt. Nach weiteren 23 Stunden wird der Versuch unterbrochen.

Untersucht wurden nur Ameisen-, Essig-, Propion- und Buttersäure. Ich führe nur Versuche auf mit Säurekonzentrationen, die bei 23 stündiger Einwirkung keine Gärung hatten zustande kommen lassen. Hierbei möchte ich noch bemerken, daß es für den Ausfall der Versuche keinen Unterschied bedingt, ob man die Säure bei Gegenwart von Zucker oder ohne diesen auf die Hefe einwirken läßt. Die diesbezüglichen Versuche führe ich nicht besonders an.

Die Hefe, die 23 Stunden unter Säureeinwirkung gestanden hat, hat von der neuen Zuckermenge vergoren	I %	II %	III %	IV %	V %	VI %
Im Kontrollversuch ohne Säure	64,8	61,7	68,7	72,2	71,3	60,0
Nach Einwirkung von 1,0 ccm n-Ameisensäure, d. h. von $^n/_{50}$-Säure	47,0	—	53,5	—	57,4	—
Nach Einwirkung von 1,5 ccm n-Ameisensäure, d. h. von $^n/_{37.3}$-Säure	—	—	46,0	—	38,26	—
Nach Einwirkung von 2,0 ccm n-Ameisensäure, d. h. von $^n/_{25}$-Säure	—	—	24,8	—	4,22	—
Nach Einwirkung von 5,0 ccm n-Essigsäure, d. h. von $^n/_{10}$-Säure	56,6	—	—	71,74	—	58,7
Nach Einwirkung von 7,5 ccm n-Essigsäure, d. h. von $^n/_{6,6}$-Säure	—	—	—	71,74	—	54,78
Nach Einwirkung von 10,0 ccm n-Essigsäure, d. h. von $^n/_5$-Säure	—	—	—	68,3	—	40,4
Nach Einwirkung von 6,0 ccm n-Propionsäure, d. h. von $^n/_{8,3}$-Säure	—	—	62,17	—	—	—
Nach Einwirkung von 5,0 ccm n-Buttersäure, d. h. von $^n/_{10}$-Säure	—	64,8	—	—	—	—

Diese Versuche zeigen, daß die Hefe durch die hier benutzten Konzentrationen nicht abgetötet, sondern lediglich in ihrer Funktion gehemmt wird; es handelt sich hier also um einen reversiblen Vorgang. Allerdings ist auch eine dauernde Schädigung bemerkbar, und es ist zu erwarten, daß bei Konzentrationen, die freilich wesentlich höher liegen als die einfach gärungsaufhebenden, die Hefe wirklich abgetötet werden kann. Bemerkenswert ist es noch, daß die entsprechenden Konzentrationen der verschiedenen Säuren der Hefe verschieden starken dauernden Schaden zufügen; und zwar scheint hier eine gewisse Reihenfolge zu bestehen, insofern als mit dem steigenden Molekulargewicht die Giftigkeit, die sich in der dauernden Beeinträchtigung der Gärkraft äußert, abnimmt. Das widerspricht allerdings den Verhältnissen bei der Alkoholreihe, wo die höheren Homologe sich giftiger erwiesen haben als die niederen, wie Dujardin und Beaumetz[1]) in eingehenden Versuchen festgestellt haben; auch Linossier[2])

[1]) Dujardin, Beaumetz und Audigé, Récherches expérimentales sur la puissance toxique des alcohols. Paris 1879

[2]) Linossier, Infl. comp. des principaux alcools. Soc. Biol. 51, 887. Zitiert nach Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen 1, 63, 1910.

fand bei der Untersuchung des Einflusses von Alkoholen auf fermentative Vorgänge, daß die Magenverdauung vom Methylalkohol am wenigsten, von den höheren Alkoholen dagegen bedeutend mehr gehemmt wird. Diese Abnahme der Giftigkeit mit dem Steigen des Molekulargewichtes widerspricht auch der Ansicht Biernackis[1]), der auf Grund seiner Untersuchungen mit organischen Körpern, freilich nicht mit Homologen einer Reihe, die Behauptung aufstellt: „Je mehr Kohle der Körper in seiner chemischen Formel besitzt, desto stärker antifermentativ wirkt er.“ Daß jedoch die Säurereihe sich anders als die Alkoholreihe verhält, fanden schon Fühner und Neubauer[2]) bei der Hämolyse durch Substanzen homologer Reihen. Bei den Alkoholen steigt mit zunehmendem Molekulargewicht die hämolytische Wirkung, bei den Säuren nimmt sie ab.

Abhängigkeit der Säurewirkung von der Konzentration.

Es ist bekannt, daß manche antifermentativ wirkenden Stoffe unabhängig von der Konzentration eine bestimmte Menge Ferment unwirksam machen. So hat Fiechter[3]) nachgewiesen, daß bei der Wirkung von Blausäure auf Gärungs- und Fäulnisvorgänge nur das Verhältnis zwischen Fermentmenge und Blausäuremenge, nicht aber die Konzentration der Flüssigkeit an Blausäure für die Wirksamkeit der letzteren maßgebend ist. Andere Stoffe dagegen müssen stets in bestimmter Konzentration vorhanden sein, wenn sie eine bestimmte Menge Ferment unwirksam machen sollen. Um zu prüfen, wie sich die von mir untersuchten Säuren in dieser Beziehung verhalten, habe ich zwei Reihen von Versuchen angestellt. In der einen setzte ich die gleiche Säuremenge zu verschiedenen Flüssigkeitsmengen hinzu, so daß also das Verhältnis zwischen Hefe und Gift gleich blieb und sich nur die Konzentration änderte. In der zweiten Reihe ließ ich die Konzentration unverändert, änderte also das Verhältnis zwischen Hefe und absoluter Giftmenge. Dabei stellte sich dann heraus, daß die Säuremenge, die bei 50 ccm Gesamtflüssigkeit die Gärung völlig hindert, nicht imstande ist,

[1]) a. a. O.

[2]) Fühner und Neubauer, Arch. f. experim. Pharmakol. 56, 344.

[3]) Fiechter, Wirkung der Blausäure auf Fermente. Diss. Basel 1875.

diese zu unterdrücken, wenn man sie in stärkeren Verdünnungen einwirken läßt. Andererseits kann man bei geringerer Gesamtflüssigkeitsmenge mit dem Säurezusatz heruntergehen. Es muß eben stets eine gewisse Konzentration an Säure vorhanden sein. Diese ist für die gleiche Hefemenge gleich. Es ist also die Konzentration und nicht die absolute Säuremenge bei der Gärungsaufhebung von entscheidender Bedeutung.

Verhältnis von Hefemenge zur Säurekonzentration.

Biernacki hat in der oben erwähnten Arbeit[1]) den Satz ausgesprochen, „daß die minimale, die Gärung aufhebende Dosis der Hefemenge direkt proportional ist“.

So fand er, daß

0,2 g	Hefe	von	1 : 2000	oder	0,005 g	Benzoesäure
0,4 „	„	„	1 : 1000	„	0,01 „	„
0,6 „	„	„	1 : 700	„	0,014 „	„
0,8 „	„	„	1 : 500	„	0,02 „	„
1,0 „	„	„	1 : 400	„	0,04 „	„

unwirksam gemacht werden. Die Konzentrationen stimmen mit seiner Behauptung überein, doch die Angabe der Gramm Benzoesäure weist in der letzten Reihe eine erhebliche Differenz auf. Bestünde der Biernackische Satz auch für unsere Säuren zu Recht, so müßte man nach Umrechnung z. B. der Resultate Bials für die von mir angewandte Konzentration imstande sein, durch einfache Multiplikation mit 6, da ich die sechsfach größere Hefemenge benutzte, ungefähr die Säuremenge zu berechnen, die bei meiner Versuchsanordnung die Gärung völlig aufheben müßte. Dabei findet man jedoch stets größere Werte als die, die ich experimentell gefunden habe. Es erschien daher notwendig, das Verhältnis von Hefemenge zur Säurekonzentration für unsere Säuren zu bestimmen, ehe man an die Vergleichung der Resultate Bials und der anderen mit meinen gehen konnte. Die Dauer der hierher gehörigen Versuche betrug 20 Stunden. Der zur Unterbrechung der Versuche nötige Zusatz von Bleiessig wurde proportional der Hefemenge gesteigert.

---

[1]) a. a. O.

Ameisensäure.

Von der ursprünglich vorhandenen Zuckermenge wurden vergoren	0,375 g (1)	0,75 g (2)	1,125 g (3)	1,5 g (4)	3,0 g (8)	4,5 g (12)	6,0 g (16)
	Hefe						
	%	%	%	%	%	%	%
Im Kontrollversuch ohne Säure . . .	38,26	43,0	54,8	81,3	96,52	100,0	100,0
Bei Zusatz von 3,0 ccm $^{n}/_{10}$-Ameisensäure, d. h. in einer $^{n}/_{167}$-Säure . .	22,6	—	—	—	—	—	—
Bei Zusatz von 4,0 ccm $^{n}/_{10}$-Ameisensäure, d. h. in einer $^{n}/_{140}$-Säure . .	3,0	20,0	—	—	—	—	—
Bei Zusatz von 5,0 ccm $^{n}/_{10}$-Ameisensäure, d. h. in einer $^{n}/_{100}$-Säure . .	0,0	14,35	27,8	—	—	—	—
Bei Zusatz von 6,0 ccm $^{n}/_{10}$-Ameisensäure, d. h. in einer $^{n}/_{90}$-Säure . .	0,0	2,6	11,3	21,0	—	—	—
Bei Zusatz von 7,0 ccm $^{n}/_{10}$-Ameisensäure, d. h. in einer $^{n}/_{72}$-Säure . .	0,0	0,0	5,2	11,7	—	—	—
Bei Zusatz von 8,0 ccm $^{n}/_{10}$-Ameisensäure, d. h. in einer $^{n}/_{62}$-Säure . .	0,0	0,0	0,0	4,8	—	—	—
Bei Zusatz von 9,0 ccm $^{n}/_{10}$-Ameisensäure, d. h. in einer $^{n}/_{55}$-Säure . .	0,0	0,0	0,0	0,0	—	—	—
Bei Zusatz von 10,0 ccm $^{n}/_{10}$-Ameisensäure, d. h. in einer $^{n}/_{50}$-Säure . .	—	—	0,0	0,0	—	—	—
Bei Zusatz von 11,0 ccm $^{n}/_{10}$-Ameisensäure, d. h. in einer $^{n}/_{45}$-Säure . .	—	—	—	—	12,2	—	—
Bei Zusatz von 12,0 ccm $^{n}/_{10}$-Ameisensäure, d. h. in einer $^{n}/_{43}$-Säure . .	—	—	—	—	0,0	15,65	—
Bei Zusatz von 13,0 ccm $^{n}/_{10}$-Ameisensäure, d. h. in einer $^{n}/_{38}$-Säure . .	—	—	—	—	0,0	7,8	—
Bei Zusatz von 14,0 ccm $^{n}/_{10}$-Ameisensäure, d. h. in einer $^{n}/_{35}$-Säure . .	—	—	—	—	0,0	3,48	11,3
Bei Zusatz von 15,0 ccm $^{n}/_{10}$-Ameisensäure, d. h. in einer $^{n}/_{33,3}$-Säure . .	—	—	—	—	—	0,0	7,4
Bei Zusatz von 16,0 ccm $^{n}/_{10}$ Ameisensäure, d. h. in einer $^{n}/_{32}$-Säure . .	—	—	—	—	—	0,0	4,0
Bei Zusatz von 17,0 ccm $^{n}/_{10}$-Ameisensäure, d. h. in einer $^{n}/_{29,4}$-Säure . .	—	—	—	—	—	—	0,0

Aus dieser Versuchsreihe geht hervor, daß kleinere Hefemengen in der Tat größere Säuremengen zur Gärungsaufhebung gebrauchen, als der einfachen Proportion entspricht.

Es werden

für	0,375 g	0,75 g	1,125 g	1,5 g	3,0 g	4,5 g	6,0 g Hefe
im Mittel	4,5	6,0	7,5	8,5	12,0	14,7	16,8 ccm

$^{n}/_{10}$-Ameisensäure verbraucht.

Tragen wir nun unsere Resultate in ein Koordinatensystem ein, wobei wir die Hefemengen (0,375 g = 1) auf der Abszisse, den Säurezusatz in Kubikzentimetern $^{n}/_{10}$-Säure auf der Ordinate abtragen, so erhalten wir die dargestellte Kurve (Fig. 1). Für

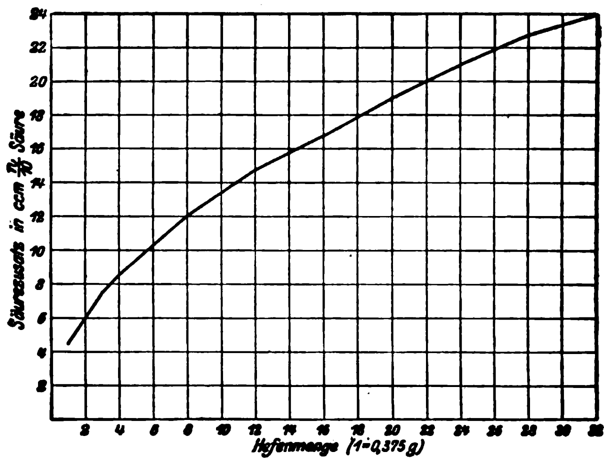


Fig. 1.

jeden Punkt dieser Kurve, der experimentell bestimmt wurde, gilt die Gleichung

$$y^2 = kx,$$

wobei $k = 18$ zu setzen ist. Diese Gleichung ist aber nichts anderes als die Gleichung einer Parabel, für die $4p = 18$ ist.

Mit Hilfe dieser Gleichung wurde nun für größere Hefemengen der nötige Säurezusatz berechnet und durch Versuche die Richtigkeit der Berechnung geprüft. Wie aus nachstehenden Tabellen ersichtlich, war mit einer für biologische Verhältnisse genügenden Genauigkeit die ausgerechnete Säurekonzentration stets die minimale gärungsaufhebende.

Berechnet wurden für 7,5 g Hefe $= 20x$ . . . 19,0 ccm $^{n}/_{10}$-Säure
„ 9,0 „ „ $= 24x$ . . . 20,9 „ „
„ 10,5 „ „ $= 28x$ . . . 23,0 „ „
„ 12,0 „ „ $= 32x$ . . . 24,0 „ „

Von der ursprünglichen Zuckermenge wurden vergoren	7,5 g Hefe %	9,0 g Hefe %	10,5 g Hefe %	12,0 g Hefe %
Bei Zusatz von 18,0 ccm $^{n}/_{10}$-Ameisensäure, d. h. in einer $^{n}/_{27,6}$-Säure	13,8	—	—	—
„ „ „ 19,0 „ „ „ „ „ $^{n}/_{26.3}$ „	0,0	—	—	—
„ „ „ 20,0 „ „ „ „ „ $^{n}/_{25}$ „	0,0	4,0	—	—
„ „ „ 21,0 „ „ „ „ „ $^{n}/_{23.8}$ „	—	0,0	3,56	—
„ „ „ 22,0 „ „ „ „ „ $^{n}/_{22.7}$ „	—	0,0	1,78	—
„ „ „ 23,0 „ „ „ „ „ $^{n}/_{21.7}$ „	—	—	0,0	6,67
„ „ „ 24,0 „ „ „ „ „ $^{n}/_{20.8}$ „	—	—	—	0,0
„ „ „ 25,0 „ „ „ „ „ $^{n}/_{20}$ „	—	—	—	0,0

Bei Essig-, Propion- und Buttersäure wurden gleichfalls Versuche in dieser Richtung angestellt, die jedoch nicht zahlreich genug sind, um eine Kurve aufstellen zu lassen. Doch zeigte sich auch hier, daß kleinere Hefemengen sicher mehr Säure benötigen, als der einfachen Proportion entspricht.

Wenn also in der Tat Hefemenge und Säurekonzentration in einem Verhältnis stehen, für das die Parabelgleichung gilt, so muß diese uns eine Handhabe werden zur Vergleichung meiner Ergebnisse mit denen der früheren Autoren.

Zu dem Zweck rechne ich alle Resultate für 50 ccm Gesamtflüssigkeit um und mit Hilfe der Parabelgleichung für 100 mg Hefe $= 1x$. Dann kommt folgende Tabelle zustande, in der k, berechnet nach den verschiedenen Untersuchern, angegeben ist.

	Meine Resultate	Bial	Lüterig und Sartori	Rosenblatt und Rozenband
Ameisensäure	7,0	10,0	6,132	144
Essigsäure	1,7	1,714	—	625
Propionsäure	2,0	2,614	—	33 124
Buttersäure	1,41	1,681	—	62 500
Isobuttersäure	1,41	—	—	—
Isovaleriansäure	1,07	—	—	—

Man ersieht, daß Bials, Lüterigs und Sartoris Ergebnisse mit meinen in einer Größenordnung liegen, während die der französischen Forscher ganz aus dem Rahmen herausfallen. Wenn bei der Ameisensäure die Werte für k etwas weit auseinanderliegen, so läßt sich diese Differenz doch durch die verschiedene Hefe, die angewandt wurde, erklären; auch ich konnte, wie weiter oben geschildert, gerade bei der Ameisensäure ein verhältnismäßig starkes Schwanken der minimalen gärungsaufhebenden Konzentration bei verschiedener Hefe feststellen. Daß im übrigen die Werte für k bei Essig-, Propion- und Buttersäure nach den Versuchen von Bial und mir so gut übereinstimmen, ist ein Beweis mehr dafür, daß Hefemenge und Säurekonzentration in einem bestimmten Verhältnis zueinander stehen, das jedoch nicht einer einfachen Proportion im Sinne Biernackis entspricht, sondern die Gleichung der Parabel erfüllt.

Ehe ich nun die Frage, ob bei der Gärungshemmung die

Dissoziation der Säuren eine Rolle spiele, zu beantworten versuche, möchte ich über Versuche berichten, die angestellt wurden, um eine vielleicht vorhandene

Adsorption der Säure durch Hefe

nachweisen zu können. Eine Entscheidung in dem einen oder anderen Sinne wäre ja auch für die Frage der Abhängigkeit von der Dissoziation in beschränktem Maße zu verwerten. Bei diesen Versuchen wurde aus äußeren Gründen die Gesamtflüssigkeitsmenge auf 40,0 ccm (mit 25,0 ccm Zuckerlösung) bemessen. Zu unserem Zweck wurde nach 22 Stunden die Flüssigkeit abzentrifugiert, ihr Volumen gemessen und der Säuregehalt durch Titration mit $^{n}/_{10}$-Natronlauge bestimmt.

I. Ameisensäure.

	1	2	3
Die angewandte Säuremenge betrug	0,046 g	0,069 g	0,092 g
Die Konzentration folglich	1:870	1:580	1:435
Die abzentrifugierte Flüssigkeit mißt	39,0 ccm	37,5 ccm	37,0 ccm
Die im Zentrifugat wiedergefundene Säuremenge	0,04577 g	0,06550 g	0,08510 g
Die Konzentration folglich	1:852	1:573	1:435

II. Essigsäure.

	1	2	3
Die angewandte Säuremenge betrug	0,30 g	0,45 g	0,60 g
Die Konzentration folglich	1:133	1:93	1:67
Die abzentrifugierte Flüssigkeit mißt	38,0 ccm	38,0 ccm	37,0 ccm
Die in ihr wiedergefundene Säuremenge	0,28728 g	0,41412 g	0,53724 g
Die Konzentration folglich	1:132	1:92	1:69

Die mitgeteilten Versuche zeigen, daß eine Konzentrationsänderung im Sinne einer Adsorption von Säure durch die Hefe sich nicht hat nachweisen lassen. Man hätte für diese schwach dissoziierten Säuren, die eine ziemlich große Adsorbierbarkeit im allgemeinen besitzen, auch hier den sicheren Nachweis der Adsorption erwartet. Aber auch Th. Paul

und seinen Mitarbeitern[1]) ist es bei ihren Versuchen an Staphylokokken nicht gelungen, für Essig- und n-Buttersäure eine Adsorption nachzuweisen, während sie für die Salzsäure, die doch im allgemeinen weniger adsorbierbar ist, Anhaltspunkte für die Annahme einer Adsorption fanden. Es ist dieses Verhalten sonderbar, um so mehr als Hertzog und Betzel[2]) in der Hefe ein gutes Adsorbens für lipoidlösliche Stoffe wie Chloroform fanden. Auch die Beobachtung Overtons[3]) über das leichte Eindringen organischer Säuren in Pflanzenzellen steht zu dem fehlenden Nachweis der Adsorption in einem gewissen Gegensatz.

Ist die Giftwirkung von der Dissoziation abhängig?

Wie eingangs erwähnt, schließt Bial[4]) aus seinen Versuchen, daß auch bei der Gärungsaufhebung durch organische Säuren das dissoziierte Wasserstoffion von ausschlaggebender Bedeutung ist. Dagegen schreiben Th. Paul, Birstein und Reuß[5]) auf Grund ihrer Versuche dem dissoziierten H-Ion gar keine Bedeutung zu.

Wenn wir zunächst die Säuren nach der Stärke ihrer Giftwirkung ordnen, so ergibt sich zu der Reihe, die nach der Größe der Dissoziationskonstanten der einzelnen Säuren geordnet ist, folgende Beziehung:

	Aufhebende Konzentration	Dissoziationskonstante nach Ostwald[6])
Ameisensäure	72,0 litrig	0,021 40
Isovaleriansäure	12,5 „	0,001 61
Essigsäure	< 11,9 „	0,001 80
Buttersäure	10,8 „	0,001 49
Isobuttersäure	10,8 „	0,001 44
Propionsäure	9,26 „	0,001 34

[1]) Th. Paul, Birstein und Reuß, Beiträge zur Kinetik der Giftwirkung von gelösten Stoffen. Diese Zeitschr. 29, 202.

[2]) R. O. Hertzog und R. Betzel, Zur Theorie der Desinfektion. Zeitschr. f. physiol. Chem. 67, 309.

[3]) a. a. O.

[4]) a. a. O.

[5]) a. a. O.

[6]) Ostwald, Grundriß der allgemeinen Chemie, S. 515.

Damit beide Reihen besser verglichen werden können, setze ich in beiden die Werte für Propionsäure = 1; dann kommt folgende Reihe zustande:

	Nach der aufhebenden Konzentration	Nach der Dissoziations-konstante
Ameisensäure	7,840	15,970
Isovaleriansäure	1,349	1,201
Essigsäure	1,285	1,343
Buttersäure	1,166	1,112
Isobuttersäure	1,166	1,075
Propionsäure	1,000	1,000

In beiden Reihen übertrifft der Wert für Ameisensäure um ein Vielfaches die Werte für die anderen Säuren, wenngleich das Verhältnis in beiden Reihen nicht genau das gleiche ist. Auch sonst stimmen die beiden Reihen ganz gut überein, sowohl was die Reihenfolge im allgemeinen, als auch die Verhältnisse zwischen den Werten für die einzelnen Säuren anbetrifft; nur Isovalerian- und Essigsäure haben ihre Plätze vertauscht. Bemerkenswert ist, daß der Unterschied in der Dissoziationskonstante der beiden Buttersäureisomeren ganz gering ist, was gut zu dem völligen Übereinstimmen beider Isomeren in der Giftwirkung bei meinen Versuchen paßt.

Nach all dem ist die Annahme, es handle sich bei der Aufhebung der Gärung nur um eine Wirkung, abhängig von der Stärke der Dissoziation der einzelnen Säuren, außerordentlich naheliegend. Allein die Differenz obiger Reihen in Beziehung auf Essig- und Isovaleriansäure, sowie in den Verhältniszahlen für die Ameisensäure läßt daran denken, daß die Dissoziation nicht die entscheidende Rolle spiele und daß die sonstige Übereinstimmung der beiden Reihen nur zufällig sei. Zur Klärung dieser Frage schlug ich dasselbe Verfahren wie Bial ein, d. h. ich setzte zu einer Säurekonzentration, die im Kontrollversuch die Gärung vollständig hemmte, steigende Mengen des neutral reagierenden Natriumsalzes der betreffenden Säure zu. Die Versuche wurden mit Ameisen- und Essigsäure angestellt.

Es ist mir, wie diese Versuche zeigen, nur einmal geglückt, durch Zusatz von 20,0 ccm n-Natriumformiat, also durch eine

1. Ameisensäure.

Von der ursprünglichen Zuckermenge wurden vergoren	Kontrollversuche ohne Säure ohne Salz %	Kontrollversuche ohne Säure mit Salz %	Versuche bei Zusatz von 1 ccm n-Säure und Natriumformiat %
Bei Zusatz von 0,5 ccm n-Natriumformiat, d. h. in einer $^n/_{100}$-Natriumformiatlös.	75,65	77,0	0,0
„ „ „ 1,0 „ „ „ „ „ „ $^n/_{50}$ „	71,74	72,17	0,0
„ „ „ 1,5 „ „ „ „ „ „ $^n/_{33.3}$ „	81,3	88,7	0,0
„ „ „ 2,0 „ „ „ „ „ „ $^n/_{25.0}$ „	71,24	86,09	0,0
„ „ „ 3,0 „ „ „ „ „ „ $^n/_{17}$ „	73,04	91,3	0,0
„ „ „ 5,0 „ „ „ „ „ „ $^n/_{10}$ „	79,47	90,43	0,0
„ „ „ 10,0 „ „ „ „ „ „ $^n/_{5}$ „	75,22	91,7	0,0
„ „ „ 20,0 „ „ „ „ „ „ $^n/_{2.5}$ „	71,3	80,0	8,26
„ „ „ 24,0 „ „ „ „ „ „ $^n/_{2.1}$ „	73,91	50,0	0,0

2,5 litrige Natriumformiatlösung bei einer 50 litrigen Ameisensäurelösung deren Giftwirkung um einen geringen Betrag herabzusetzen, während bei geringerer molekularer Konzentration keine Wirkung zu erzielen war. Die Gaben des Natriumformiats noch weiter zu steigern, schien aussichtslos, da im letzten Versuche die 2,1 litrige Natriumformiatlösung schon allein eine deutliche, wenn auch nicht vollständige Hemmung der Gärung herbeigeführt hatte. Hinweisen möchte ich auch noch auf die Tatsache, daß die benutzten Gaben von ameisensaurem Natrium stets eine gewisse Beförderung der Gärung gegenüber dem Kontrollversuch verursacht haben, die im günstigsten Falle den Betrag von ca. 20 % erreicht hat. Das Natriumsalz wirkt also ähnlich wie die Säure selber.

2. Essigsäure.

Von der ursprünglichen Zuckermenge wurden vergoren	Kontrollversuche ohne Säure, ohne Salz %	Kontrollversuche ohne Säure, mit Salz %	Versuche bei Zusatz von 4,4 ccm n-Säure und Salz %
Bei Zusatz von 4,4 ccm n-Natriumacetat, d. h. in einer $^n/_{11.4}$-Natriumacetatlös.	81,3	82,2	8,7
„ „ „ 6,6 „ „ „ „ „ „ $^n/_{7.6}$ „	81,7	87,0	20,0
„ „ „ 8,8 „ „ „ „ „ „ $^n/_{5.7}$ „	71,7	83,5	19,57
„ „ „ 13,2 „ „ „ „ „ „ $^n/_{3.8}$ „	74,78	8[illegible],09	17,4
„ „ „ 20,6 „ „ „ „ „ „ $^n/_{2.4}$ „	78,26	83,0	18,36
„ „ „ 20,6 „ 2n- „ „ „ „ „ $^n/_{1.2}$ „	75,22	18,26	0,0

In allen diesen Versuchen ist durch den Zusatz des neutralen Natriumacetats eine deutliche Abschwächung der gärungsaufhebenden Wirkung der Essigsäure herbeigeführt worden. Am stärksten war der entgiftende Einfluß des Salzes, als eine 5,7 litrige Natriumacetatlösung auf die 11,4 litrige Essigsäure einwirkte; hier betrug die Abschwächung der Essigsäure ca. 20%. Damit stehen jedoch meine Resultate hinter den Ergebnissen Bials weit zurück, der bestenfalls eine fast vollständige Ausschaltung der gärungshemmenden Wirkung der Essigsäure feststellen konnte. Bemerkenswert ist, daß dieser günstigste Effekt sowohl bei Bial wie bei mir bei einem Zusatz von Natriumacetat erzielt worden ist, der ungefähr der doppelten Menge der angewandten Essigsäuremoleküle entspricht. Größere Gaben des Salzes halten die Wirkung auf gleicher Höhe, bis schließlich das Salz selbst gärungshemmend wirkt.

Bial konnte auf Grund seiner Versuche wohl die Ansicht aussprechen, daß die Dissoziation bei der Gärungshemmung die entscheidende Rolle spiele. Meine Versuchsergebnisse stehen jedoch in Gegensatz zu dieser Ansicht; danach können höchstens 20% der Essigsäurewirkung den dissoziierten Anteilen zugeschrieben werden. Es käme ja dann allerdings dafür nur das H-Ion in Betracht, denn das Säureanion wirkt, wie auch meine Versuche mit dem Neutralsalz allein zeigen, in den bei der Säure angewandten und wirksamen Konzentrationen nicht gärungshemmend, im Gegenteil sogar etwas beschleunigend.

Völlig erschüttert wird aber meiner Ansicht nach die Theorie von der antiseptischen Funktion des H-Ions verdünnter organischer Säuren durch die von mir angestellten Versuche mit Ameisensäure und ameisensaurem Natrium. Ameisensäure hat eine bedeutend höhere Dissoziationskonstante und ist in 4 mal geringerer molekularer Konzentration als Essigsäure angewandt worden; es stünde also zu erwarten, daß, wenn es sich bei ihr um eine Wirkung des H-Ions handelte, die Herabsetzung der Dissoziation durch zugefügtes Neutralsalz eine ganz wesentliche Herabsetzung der Gärungshemmung zur Folge haben müßte, jedenfalls müßte doch diese Beeinflussung deutlicher als bei der Essigsäure sein. Das ist jedoch keineswegs der Fall; nur ein einziges Mal wurde durch einen ziemlich hohen Salzgehalt — 20 mal mehr Salzmoleküle als Säure-

moleküle — die Hemmung herabgesetzt, während bei der Essigsäure die doppelte Anzahl Salzmoleküle die stärkste Wirkung schon erzielte.

Wäre das dissoziierte H-Ion der wesentlichste Faktor bei der Wirkung organischer Säuren, dann müßten sich die Mengen, die erforderlich sind zur Gärungsbeschleunigung, ordnen nach den Dissoziationskonstanten der einzelnen Säuren; denn bei den in jenen Versuchen angewandten geringen molekularen Konzentrationen sind die Säuren am stärksten dissoziert und die Abhängigkeit ihrer Wirkung von der Dissoziation müßte am deutlichsten zur Geltung kommen. Wie aber weiter oben gezeigt wurde, ordnen sich die Säuren in jenen Versuchen nach dem Molekulargewicht, eine Ordnung, die mit der nach den Dissoziationskonstanten aufgestellten nicht identisch ist.

Nach alledem bin ich der Überzeugung, daß die Hauptrolle bei der gärungshemmenden Wirkung der untersuchten Säuren das nicht dissoziierte Molekül spielt. Das Anion ist in den angewandten Konzentrationen ohne Bedeutung, während das Wasserstoffion einen, wenn auch nicht sehr bedeutenden Faktor bei der Gärungshemmung darstellt.

Zusammenfassung.

1. Ameisensäure und ihre höheren Homologe vermögen bei genügender Verdünnung die Hefegärung zu beschleunigen; das Optimum der einzelnen Säuren liegt bei der gleichen molekularen Konzentration.

2. Die minimalen gärungsaufhebenden Säuremengen töten die Hefe nicht ab.

3. Die Gärungsaufhebung ist von der Konzentration, nicht von dem absoluten Gehalt an Säure abhängig.

4. Hefemengen und die zur Gärungsaufhebung nötigen Konzentrationen verhalten sich nicht direkt proportional zueinander, sondern stehen in einem Verhältnis, das die Gleichung der Parabel erfüllt.

5. Eine nachweisbare Adsorption der Säure durch die Hefe findet nicht statt.

6. Bei der Säurewirkung spielen nicht die Ionen, sondern das nicht dissoziierte Moleküle die Hauptrolle.

Über das Verhalten der Essigsäure bei künstlicher Durchblutung der Leber.

Von

Adam Loeb.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 3. November 1912.)

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit haben Embden und Oppenheimer[1]) die Beobachtung gemacht, daß Brenztraubensäure, die allem Anschein nach als ein in größter Menge beim Abbau der Kohlenhydrate auftretendes normales intermediäres Stoffwechselprodukt anzusehen ist, bei der künstlichen Durchblutung der Leber Acetessigsäure bildet. Diese Acetessigsäurebildung nimmt höchstwahrscheinlich ihren Weg über Acetaldehyd, der das nächste Abbauprodukt der Brenztraubensäure im Tierkörper sein dürfte. Die Acetessigsäurebildung aus der Brenztraubensäure bzw. aus dem aus dieser entstandenen Acetaldehyd wird von den genannten Autoren nur als eine Nebenreaktion angesehen, während der Hauptweg des Acetaldehydabbaues über Essigsäure führen dürfte. Hiernach wäre auch die Essigsäure ein normales intermediäres Abbauprodukt der Kohlenhydrate.

Frühere Untersuchungen haben es wahrscheinlich gemacht, daß Essigsäure auch bei der Verbrennung von Fettsäuren im tierischen Organismus intermediär gebildet wird. Namentlich liegt es sehr nahe, anzunehmen, daß die Acetessigsäure, die ihrerseits beim Abbau der normalen Fettsäuren mit gerader C-Atomzahl auftritt, bei ihrem weiteren Abbau unter Wasseraufnahme in 2 Moleküle Essigsäure zerfällt, wenngleich hierfür

[1]) Embden und Oppenheimer, diese Zeitschr. **45**, 186.

der experimentelle Beweis bisher nicht erbracht werden konnte. [Embden und Michaud[1]), Dakin und Wakeman[2]).]

Sollte die eben ausgesprochene Anschauung über den Abbau der Acetessigsäure zutreffen, so wäre damit erwiesen, daß auch verschiedene als Spaltprodukte der Eiweißkörper auftretende Aminosäuren[3]), deren Abbau im Tierkörper unter intermediärem Auftreten von Acetessigsäure verläuft, als Quellen für die Essigsäure in Betracht kommen. Die Essigsäure wäre also hiernach als ein gemeinsames Abbauprodukt der Kohlenhydrate, Fette und Eiweißkörper anzusehen.

Der direkte Nachweis des Auftretens von Essigsäure bei bestimmten Abbauvorgängen mußte daher von ebenso großem Interesse sein, wie die weiteren Schicksale, die sie bis zu ihrer völligen Verbrennung zu Kohlensäure und Wasser erleidet. Ich habe im Anschluß an die oben erwähnte Arbeit von Embden und Oppenheimer auf Veranlassung von Prof. Embden versucht, ob sich nach der Durchblutung der Leber unter Brenztraubensäurezusatz Essigsäurebildung nachweisen läßt, konnte aber keine Anhaltspunkte dafür gewinnen und wandte mich zunächst der Frage zu, ob dem Durchströmungsblute zugesetzte Essigsäure verschwindet. Das ist nun in der Tat der Fall, wie aus der nachstehenden Tabelle I hervorgeht. (Versuche 1 und 2.)

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Versuchs-Nr.	Gewicht des Hundes	Gewicht der Leber	Menge der dem Durchblutungsblute als NH_4-Salz zugesetzten Essigsäure	Essigsäure wiedergewonnen aus je 1500 ccm Filtrat A	Essigsäure wiedergewonnen aus je 1500 ccm Filtrat B	Aus Kolonne 5 für das Gesamtblut berechnete Menge Essigsäure A	Aus Kolonne 6 für das Gesamtblut berechnete Menge Essigsäure B	Essigsäure verschwunden	Essigsäure verschwunden, in Prozent des Ausgangswertes	Bemerkungen
	kg	g	g	g	g	g	g	g		
1	7,5	225	1,46	0,2238	0,0168	1,43	0,11	1,32	90	
2	7,0	260	3,88	0,5814	0,3912	3,61	2,43	1,18	30	Die Menge des Durchblutungsblutes betrug nur 1550 ccm

[1]) Embden und Michaud, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 332.

[2]) Dakin und Wakeman, Journ. of Biolog. Chem. 6, 373.

[3]) In Frage kommen das Leucin, Phenylalanin, Tyrosin und unter gewissen Umständen anscheinend auch das Isoleucin.

Spalte 4 gibt die Menge der zum Durchblutungsblut in Form ihres Ammonsalzes zugesetzten Essigsäure an. Die Ergebnisse der Essigsäurebestimmungen im Blute A (vor der Durchblutung) und im Blute B (nach 1stündiger Durchblutung) gehen aus den Spalten 5 und 6, die unmittelbar vergleichbar sind, hervor. Wie man sieht, ist in beiden Versuchen der Essigsäuregehalt des Blutes B weitaus geringer als der des Blutes A. In den Kolonnen 7 und 8 sind die Essigsäurewerte der beiden vorhergehenden Spalten auf die gesamte bei der Durchströmung verwendete Blutmenge umgerechnet. In Versuch 1 sind von 1,43 g am Anfang vorhandener Essigsäure am Ende des Versuchs nur noch 0,11 g nachweisbar; 1,32 g oder 90% der ursprünglich vorhandenen Essigsäure sind also verschwunden (Kolonne 9 und 10). In Versuch 2 ist die Menge der verschwundenen Essigsäure nur um wenig geringer als in Versuch 1; in Prozenten des Ausgangswertes (30%) ist die Essigsäureabnahme hier allerdings erheblich geringer. Ein dritter Versuch, der im Prinzip zu einem ganz ähnlichen Ergebnis führte, konnte in die Tabelle wegen Unzuverlässigkeit des A-Wertes keine Aufnahme finden.

Von Interesse ist noch ein Vergleich der Spalten 4 und 7, in denen sich die Mengen der zugesetzten Essigsäure und der aus der Essigsäurebestimmung im Blut A berechneten Essigsäure verzeichnet finden; wie man sieht, stimmen in beiden Versuchen die Werte ausreichend miteinander überein, wenn auch die an den Blutfiltraten vorgenommenen Bestimmungen ein wenig zu geringe Werte lieferten.

Der Essigsäuregehalt der durchbluteten Leber wurde mehrfach am Schlusse des Versuches bestimmt und nach Abzug der dem in ihr enthaltenen Blut angehörigen Essigsäure stets erheblich geringer gefunden, als einer gleichmäßigen Verteilung zwischen Blut und Leber entsprechen würde.

Rinderblut als solches scheint nicht imstande zu sein, Essigsäure zum Verschwinden zu bringen; wenigstens ergab ein Versuch, in dem Rinderblut mit einer unseren Durchblutungsversuchen entsprechenden Menge Natriumacetats 2 Stunden bei 40° gehalten wurde, keine Abnahme der Essigsäure:

Filtrat A: 0,347 g Essigsäure
" B: 0,343 " "

Der zugesetzten Natriumacetatmenge würde ein Essigsäurewert von 0,331 g entsprechen.

Über das Schicksal der verschwundenen Essigsäure besagen diese Versuche natürlich nichts.

In den Versuchen von Embden und Oppenheimer[1]) trat die Acetessigsäurebildung aus Brenztraubensäure nicht mit völliger Regelmäßigkeit ein, was, wie bereits oben erwähnt, darauf zurückgeführt wurde, daß die Hauptmenge des Acetaldehyds weiter zu Essigsäure oxydiert werde. Es lag sehr nahe, zu untersuchen, ob diese Umwandlung des intermediär aus Brenztraubensäure gebildeten Aldehyds in Essigsäure durch Zusatz von Essigsäure zum Durchströmungsblute gehemmt werden könnte. Eine solche hemmende Wirkung würde zu erwarten sein, wenn die Umwandlung von Acetaldehyd in Essigsäure den Charakter einer Gleichgewichtsreaktion hätte, also reversibel wäre.

Ehe ich an Leberdurchblutungsversuche mit gleichzeitigem Zusatz von Essigsäure und Brenztraubensäure herantreten konnte, war es natürlich notwendig, zu untersuchen, ob etwa Essigsäure allein auf den Umfang der Acetessigsäurebildung in der Leber im Sinne einer Steigerung einwirkt.

In zehn übereinstimmenden Versuchen konnte ich feststellen, daß Essigsäurezusatz den Umfang der Acetessigsäurebildung in der Leber ganz regelmäßig und ganz beträchtlich steigert.

Die Versuche sind in Tabelle II, Versuch 3 bis 12, zusammengestellt; Spalte 5 gibt die Acetonbildung pro Liter Durchblutungsblut, und zwar berechnet nach der Titration des Destillats aus saurer Lösung; die eingeklammerte Zahl ergibt den Acetonwert nach Redestillation aus alkalischer Lösung. Die Acetonbildung schwankt zwischen 60 mg (Versuch 11) und 232 mg (Versuch 7). Essigsäure ist demnach als ein kräftiger Acetessigsäurebildner anzusehen. Wenn wir von dem besonders hohen Wert des Versuches 7 absehen, in dem der Umfang der Acetessigsäurebildung von einer Höhe ist, wie sie nur bei Zusatz ganz weniger Substanzen erreicht wird, kommt die Essigsäure in ihrer Fähigkeit, Acetessigsäure zu bilden, etwa der Isovaleriansäure gleich.

---

[1]) Embden und Oppenheimer, l. c.

Das Ergebnis meiner Versuche steht in ungeklärtem Widerspruch mit den Angaben von E. Friedmann[1]) der in zwei Versuchen, die, soweit ersichtlich, unter den von Embden und seinen Mitarbeitern gewählten Bedingungen angestellt wurden, eine Einwirkung des Essigsäurezusatzes auf die Acetessigsäurebildung nicht beobachten konnte.

Tabelle II.

1	2	3	4	5	6		7
Versuchs-Nr.	Gewicht des Hundes kg	Gewicht der Leber g	Dem Durchblutungsblut zugesetzte Menge Essigsäure g	Gebildete Menge Aceton pro Liter Durchblutungsblut mg	Werte des Masudaverfahrens. Destillat aus je 250 ccm Blut redestill. ohne Silberoxyd. Verbrauchte ccm $^{n}/_{10}$-Jodlösung	mit Silberoxyd. Verbrauchte ccm $^{n}/_{10}$-Jodlösung	Bemerkungen
3	7,5	211	2,2 als NH_4-Salz	63 (63)	—	—	Versuchsdauer
4	7,3	198	do.	68 (68)	—	—	53 Minuten
5	9,6	312	do.	103 (103)	—	—	
6	7,7	145	2,2 als Na-Salz	64 (64)	16,25	14,65	Hund hatte 3 Tage
7	6,5	150	do.	232 (219)	48,85	48,9	gehungert
8[2])	5,0	155	do.	86 (84)	18,95	17,85	Aceton aus Acet-
9	6,0	120	do.	75 (72)	—	—	essigsäure 64 mg
10	6,7	175	2,6 als Na-Salz	130	—	—	
11	5,6	190	2,0 als Na-Salz	60 (55)	—	—	
12	6,0	163	do.	81	—	—	

Von Baer und Blum[3]) liegen übrigens zwei Versuche mit Essigsäureverabreichung an phlorizinisierte Hungerhunde vor, aus denen die genannten Autoren folgern, daß der Essigsäure keine antiketogene Wirkung zukommt; ob die in der Tat recht hohen Acetonkörperwerte vielleicht gerade eine Folge der verabreichten Essigsäure sind, entzieht sich unserer Beurteilung.

In Versuch 9 wurde die aus 3000 ccm Filtrat B erhältliche Menge Dibenzalaceton unter den hier üblichen Bedingungen bestimmt; es wurden 0,0374 g gewonnen, also das 1,9 fache von entsprechenden Leerversuchen. In Versuch 8 wurde neben der Bestimmung des Gesamtacetons im Blute B auch eine

[1]) E. Friedmann, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **11**, 202.

[2]) Ein Leerversuch mit dem gleichen Durchblutungsblute wie in Versuch 8 ergab 25 mg Aceton pro Liter Durchblutungsblut.

[3]) Baer und Blum, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **10**, 86.

solche des Acetons aus Acetessigsäure vorgenommen; die aus Acetessigsäure gebildete Acetonmenge betrug pro Liter 64 mg gegenüber 84 mg Gesamtaceton.

In drei Versuchen (6, 7 und 8) suchte ich festzustellen, ob bei der Durchströmung mit Essigsäure außer Acetessigsäure und Aceton auch mit Wasserdampf flüchtige jodbindende Substanzen aldehydartiger Natur auftreten. Ich wandte zu diesem Zwecke das kürzlich von Masuda[1]) aus dem hiesigen Institut beschriebene Verfahren an: Je 3000 ccm Filtrat B wurden destilliert; in Versuch 6 wurde das gewonnene Destillat ohne weiteres in zwei gleiche Teile geteilt, von denen der eine unter Zusatz von etwas Talcum, der andere mit frisch gefälltem Silberoxyd und Talcum redestilliert wurde. Wie aus den Angaben der Spalte 6 ersichtlich ist, besteht zwischen der ohne und zwischen der mit Silberoxyd destillierten Bestimmung ein Unterschied von nicht weniger als 1,6 ccm $^{n}/_{10}$-Jodlösung. Dieser Unterschied kann nicht durch flüchtige jodbindende Säuren bedingt sein, da der Acetonwert nach Redestillation aus alkalischer Lösung ebenso groß war, wie bei direkter Titration des aus saurer Lösung gewonnenen Destillats. In den Versuchen 7 und 8 waren die Destillate, an denen die Bestimmungen nach Masuda vorgenommen wurden, aus alkalischer Lösung redestilliert. In Versuch 7 ist mit Silberoxyd zerstörbare flüchtige, jodbindende Substanz nicht nachweisbar, während die in Versuch 8 zwischen den Bestimmungen mit und ohne Silberoxydzusatz gefundene Differenz von 1,1 ccm weit außerhalb der Fehlergrenze der Methode liegt.

Wenn die Tatsache, daß Essigsäure den Umfang der Acetessigsäurebildung in der Leber unter den von Embden und seinen Mitarbeitern gewählten Bedingungen regelmäßig um ein beträchtliches steigert, keinem Zweifel unterliegen kann, so ist die Deutung meiner Versuchsergebnisse sicher keine einfache.

Bei weitem am wahrscheinlichsten erscheint es mir, daß die Essigsäure dadurch den Umfang der Acetessigsäurebildung vermehrt, daß sie den Abbau der Acetessigsäure hemmt. Eine zweite, von vornherein nicht auszuschließende Möglichkeit ist die, daß sie hemmeud auf die Oxydation von Acetaldehyd zu Essig-

[1]) Masuda, diese Zeitschr. 45, 140.

säure einwirkt (siehe oben), und daß deswegen bei dem Kohlenhydratabbau in der isolierten Leber gebildeter Acetaldehyd in vermehrtem Umfang den Seitenweg zur Acetessigsäure einschlägt (vgl. Embden und Oppenheimer). Beide Arten der Hemmung wären jedenfalls am einfachsten erklärbar durch die Annahme einer Gleichgewichtsreaktion. Wir wollen an dieser Stelle nur die erste der genannten Möglichkeiten besprechen und werden auf die zweite in einer folgenden Arbeit zurückkommen.

Wenn der normale Abbau der Acetessigsäure zu Essigsäure führt, und diese Reaktion den Charakter einer Gleichgewichtsreaktion hat, ihrem Wesen nach also reversibel ist, so läßt sich das am einfachsten durch folgende Formulierung ausdrücken:

$$CH_3—CO—CH_2—COOH + H_2O \rightleftarrows CH_3—COOH + CH_3—COOH.$$

Eine derartige Formulierung besagt, daß man eine direkte Neubildung von Acetessigsäure aus der Essigsäure annehmen muß, wobei ein Molekül Essigsäure mit einem zweiten unter Wasseraustritt zu Acetessigsäure zusammentreten würde; die Acetessigsäurebildung würde in diesem Falle also durch Acetylierung der Essigsäure zustande kommen. Eine solche Annahme liegt um so näher, als Acetylierungsprozesse im tierischen Organismus weit verbreitet sind, und nach einer von O. Neubauer und Warburg[1]) ausgeführten Untersuchung auch in der künstlich durchströmten Leber vorkommen können, wenngleich eine zur Verkettung zweier C-Atome führende Acetylierung im Tierkörper bisher unbekannt ist.

Wie bereits zu Eingang dieser Arbeit erwähnt, ist Essigsäure allem Anscheine nach ein auf dem Hauptweg des Abbaus von Kohlenhydraten, Fetten und verschiedenen Eiweißbausteinen gelegenes intermediäres Produkt, und gerade deswegen ist es von vornherein möglich, daß die Essigsäure hemmend auf den Abbau sehr verschiedenartiger Substanzen einwirkt. Ob nun eine der von mir ins Auge gefaßten Möglichkeiten der Acetessigsäurebildung aus Essigsäure zutrifft oder nicht: die Tatsache der starken Einwirkung der Essigsäure auf den Umfang der Acetessigsäurebildung in der Leber ist vielleicht nicht ohne praktische Bedeutung. Offenbar tritt bei

---

[1]) Neubauer und Warburg, Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**, 1.

Zuckerkranken Essigsäure in vermehrter Menge auf, wie aus ihrem abnorm reichen Vorhandensein im Harne von Zuckerkranken hervorgeht. So gibt Rumpf[1]) für einen Fall von Diabetes etwa 5 g Tagesausscheidung an, und aus den Zahlen von Herter und Wakeman[2]) berechnen sich (als Essigsäure) 1,8 g flüchtige Fettsäure.

Es ist zum mindesten sehr möglich, daß eine Anhäufung von Essigsäure im Organismus von Zuckerkranken die Acidosis ungünstig beeinflußt, und es erscheint von vornherein nicht ausgeschlossen, durch Beseitigung dieser Substanz, etwa auf dem Wege der Einführung leicht acetylierbarer Körper, mit Erfolg therapeutisch auf die Acidose einzuwirken[3]).

Derartige Versuche sowie die weitere Aufklärung des Chemismus der Acetessigsäurebildung aus Essigsäure bilden den Gegenstand einer von Embden und mir in Angriff genommenen weiteren Versuchsreihe.

Technik der Versuche.

Die Durchblutung der Leber erfolgte in der im hiesigen Institut üblichen Weise. Die Versuchsdauer betrug 1 Stunde, die Menge frischen defibrinierten Rinderblutes 1600 ccm, wo nicht ausdrücklich anderes vermerkt ist. Die Hunde hatten 24 Stunden gehungert.

Die Essigsäurebestimmung geschah nach der von Welde[4]) angegebenen Methode der Vakuumdampfdestillation; die übergegangenen Säuremengen wurden titriert und als Essigsäure berechnet. Ich habe mich nochmals von der Richtigkeit der Angabe Weldes, daß Milchsäure nicht übergeht, überzeugt; ebenso gehen auch Brenztraubensäure und Oxybuttersäure nicht in nennenswerten Mengen über. Dagegen war in meinen Versuchen die Dauer der Versuche weit größer, als bei Welde angegeben ist: gelegentlich mußten die Destillationen

[1]) Rumpf, Berl. klin. Wochenschr. 1895, 31/32.

[2]) Herter und Wakeman, zitiert nach Neubauer-Huppert (11. Auflage) 197.

[3]) Schon auf Grund der vorliegenden Untersuchungen dürfte es jedenfalls geboten erscheinen, Zuckerkranke mit Acidosis vor dem Genuß von Essigsäure in größerer Menge zu warnen.

[4]) Welde, diese Zeitschr. 28, 504.

bis 12 Stunden ausgedehnt werden, bis sicher nichts mehr überging. Es lag dies wohl daran, daß ich mit größeren Flüssigkeitsmengen als Welde zu arbeiten gezwungen war. In allen Fällen wurden die erhaltenen Destillate, die oft noch mitgerissene Mengen Phosphorsäure enthielten, nochmals vorsichtig redestilliert. Das zweite Destillat war stets von Mineralsäure frei.

Im einzelnen ging ich folgendermaßen vor:

Das Blut wurde nach Schenck enteiweißt, die Filtrate waren also sechsfach verdünnt; diese wurden entquecksilbert, und der Schwefelwasserstoff durch einen Luftstrom verjagt. Aliquote abgemessene Filtratquanten wurden neutralisiert, mit Salzsäure wieder schwach angesäuert und zur Zerstörung der Acetessigsäure eine halbe Minute aufgekocht. Dann wurde nach Phosphorsäurezusatz die Essigsäure nach Welde bestimmt.

In einem Versuche wurde auf entstandene Ameisensäure gefahndet, ohne daß ihr Nachweis gelang.

Die Acetonbestimmungen erfolgten ganz in der hier üblichen Weise an 500 ccm des nicht entquecksilberten Filtrats.

Die zu den Durchblutungsversuchen als Ammonsalz verwandte Essigsäure war in den Versuchen 1 bis 5 verdünnter Eisessig, dessen Menge durch Titration mit $^{n}/_{10}$-Natronlauge berechnet wurde. In den weiteren Versuchen wurde Natriumacetat verwendet, dessen Reinheit aus folgender Krystallwasserbestimmung hervorgeht:

Für die Krystallwasserbestimmung angewandte Substanz	0,9874 g
Gewicht der Substanz nach dem Trocknen bei 108° zur Konstanz	0,5956 g
Daraus berechnete Wassermenge	0,3918 g
Wasser gefunden	39,68%
„ berechnet	39,70%

Untersuchungen über Permeabilität und antagonistische Elektrolytwirkung nach einer neuen Methode.

Von

Jacques Loeb.

(Aus dem Rockefeller Institute for Medical Research, New York.)

(Eingegangen am 24. Oktober 1912.)

I.

Vor 12 Jahren führte ich den Begriff der physiologisch äquilibrierten Salzlösung ein[1]). Als Beispiele derartiger Lösungen dürfen das Seewasser oder eine Mischung von NaCl + KCl + $CaCl_2$ in dem Verhältnis dienen, in dem diese Salze im Seewasser enthalten sind. Die Notwendigkeit der Einführung dieses Begriffes gründete sich auf die Tatsache, daß Lösungen von einzelnen Salzen, z. B. NaCl, in der Konzentration, in der dieses Salz im Seewasser enthalten ist, für die meisten Seetiere giftig sind, während der Zusatz von kleinen Mengen gewisser anderer Salze, besonders der Salze mit zweiwertigem Kation, diese Giftigkeit verringert[2]). Physiologisch äquilibrierte Salzlösungen sind nun solche, in denen die giftigen Wirkungen, die jedes Salz hätte, wenn es allein in Lösung wäre, sich gegenseitig aufheben; in denen m. a. W. der gegenseitige Antagonismus der einzelnen Bestandteile möglichst vollständig ist. Die Frage entstand, was der Mechanismus dieser antagonistischen Salzwirkung ist.

Vor 7 Jahren stellte ich die Hypothese auf, daß das Wesen der antagonistischen Salzwirkungen darauf beruht, daß die

---

[1]) Amer. Journ. of Physiol. 3, 434, 1900. Abgedruckt in „Untersuchungen über künstliche Pathogenese", S. 99. Leipzig 1906.

[2]) Amer. Journ. of Physiol. 3, 327, 1900; Arch. f. d. ges. Physiol. 88, 68, 1901; Amer. Journ. of Physiol. 6, 411, 1902.

Lösung eines einzelnen Salzes, wenn seine Konzentration in der Lösung hoch genug ist, die Durchlässigkeit der Zellmembranen (oder der äußeren Membran von Eiern) erhöht und daß infolgedessen das Salz in die Zellen eindringt und die dort stattfindenden chemischen Reaktionen oder die physikalischen Prozesse, oder beide, modifiziert[1]). Der Zusatz des antagonistischen Salzes hemmt nun nach dieser Ansicht diese Erhöhung der Durchgängigkeit resp. verzögert die Geschwindigkeit, mit der diese Änderung eintritt. Eine physiologisch äquilibrierte Salzlösung ist also danach eine Lösung, in der die spezifische, für die Erhaltung des normalen Lebens der Zelle geeignete Permeabilität am längsten, ev. dauernd, erhalten bleibt.

Die beste Gelegenheit zur Untersuchung dieser antagonistischen Salzwirkungen bieten nun Organismen, die in hohem Grade von der Konzentration des umgebenden Mediums unabhängig sind, wie beispielsweise Fundulus. Eine Reihe von Versuchen an Fundulus, die ich in den letzten Jahren zum Teil im Verein mit H. Wasteneys ausgeführt habe, lassen sich leicht auf Grundlage der Theorie der antagonistischen Salzwirkungen verstehen[2]). Von botanischer Seite ist diese Theorie von Osterhout angenommen worden, der neuerdings dieselbe durch eine sehr schöne Methode der elektrischen Widerstandsbestimmung an Laminaria gestützt hat[3]).

Aber die Zahl der Beispiele, in denen eine direkte Stütze gewonnen war, ist noch immer sehr beschränkt. Die beste Stütze blieb nach wie vor die Tatsache, daß alle bisher gemachten Beobachtungen mit der Theorie übereinstimmen. Es war mir darum zu tun, mehr Beweismaterial zu finden und namentlich an dem Material, an dem die Theorie gewonnen war, nämlich am Ei von Fundulus, womöglich durch direkte Versuche den Nachweis zu führen, daß die antagonistische Salzwirkung in der Tat auf einer mehr oder weniger vollständigen Erhaltung der normalen spezifischen Durchgängigkeit der Zelle beruht. Dieser Nachweis ist mir nun auf Grund einer neuen Untersuchungsmethode am Ei von Fundulus gelungen.

---

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. **107**, 252, 1905. Vorlesungen über die Dynamik der Lebenserscheinungen, S. 81 u. ff. Leipzig 1906.

[2]) Science **34**, 653, 1911.

[3]) Science **35**, 112, 1912.

Dabei gelang es aber auch, eine andere Frage in den Bereich der Untersuchung zu ziehen, nämlich ob Lipoide oder Eiweißkörper für die Erscheinung der spezifischen Permeabilität verantwortlich sind. Es werden Versuche angeführt, die darauf hinweisen, daß die Permeabilität der Membranen für Wasser und Salze durch die Eiweißkörper der Membran bestimmt ist.

Die folgenden Versuche sind alle am befruchteten Ei von Fundulus angestellt, und die neue Methode gründet sich auf den Nachweis der Erhöhung des spezifischen Gewichtes der Eier unter dem Einfluß hypertonischer Lösungen. Um diese Versuche zu verstehen, muß der Leser im Auge behalten, daß das Ei von einer derben Haut umgeben ist, die im folgenden als Eihaut oder als Eimembran bezeichnet wird. Innerhalb dieser Membran befindet sich der Dottersack mit dem Embryo; der Dottersack steht in keinem Zusammenhang mit der Eihaut, sondern ist frei innerhalb derselben beweglich. Normal ist die Eihaut straff gespannt, was darauf hinweist, daß das Ei prall mit einer Flüssigkeit gefüllt ist. Wenn man nun dem Ei durch Diffusion Wasser entzieht, so diffundiert zuerst das Wasser zwischen der Membran und dem Dottersack, wodurch die Eihaut oft, aber nicht immer, kollabiert oder Dellen erhält. Infolge der Erhöhung des osmotischen Druckes der Flüssigkeit zwischen Eihaut und Membran wird dann dem Dotter Wasser entzogen und derselbe schrumpft. Diese Schrumpfung führt zur Erhöhung des spezifischen Gewichtes des Eies. Auf diese Erhöhung des spezifischen Gewichtes des Eies gründet sich die neue, sehr bequeme Methode zur Untersuchung der Permeabilität der Eihaut von Fundulus.

Die Eier von Fundulus haben normalerweise ein spezifisches Gewicht, das erheblich höher ist als das von Seewasser; es liegt zwischen dem einer $^{11}/_{8}$ und $^{12}/_{8}$ m-NaCl-Lösung. Bringen wir die Eier in eine Lösung, deren spezifisches Gewicht über der eben erwähnten Grenze liegt, so werden sie so lange an der Oberfläche der Lösung schwimmen, als ihr spezifisches Gewicht niedriger ist als das der Lösung. Wäre nun die Durchgängigkeit der Eihaut unveränderlich, so sollte der Zeitpunkt des Sinkens abhängen 1. vom osmotischen Druck der umgebenden Lösung und 2. vom spezifischen Gewicht derselben.

Je größer der Unterschied des osmotischen Druckes der umgebenden Lösung und der Flüssigkeit im Ei, um so rascher muß das letztere Wasser verlieren; je höher das spezifische Gewicht der umgebenden Lösung, um so länger wird es dauern, bis das Ei genug Wasser verloren hat, um zu sinken. Wir sehen aber, daß für die Geschwindigkeit des Sinkens an erster Stelle eine ganz andere Variable ausschlaggebend ist, nämlich die Natur der Lösung, in der die Eier sich befinden. Das weist darauf hin, daß die Permeabilität der Eihaut nicht konstant ist, sondern daß dieselbe durch die Lösung, in der sich das Ei befindet, modifiziert wird.

Im ersten Teil dieser Arbeit wollen wir nun zeigen, daß in bezug auf die Geschwindigkeit des Sinkens ein prinzipieller Unterschied zwischen physiologisch äquilibrierten Lösungen und nicht äquilibrierten Lösungen besteht. In den letzteren sinken die Eier im allgemeinen rasch, in den ersteren sehr langsam, was wir auch auf Grund unserer Theorie der antagonistischen Salzwirkungen erwarten sollten.

Was nun die Methode der Versuche im einzelnen betrifft, so bestand sie darin, daß verschiedene Lösungen in Reagensgläser und je vier befruchtete Eier von Fundulus in je eine solche Lösung gebracht wurden; dann wurde die Zeit gemessen, während der die Eier an der Oberfläche der Lösung schwammen. Diese Lösungen mußten hypertonisch sein, d. h. ihre Konzentration mußte höher sein als die des Seewassers oder einer $^{m}/_{2}$ bis $^{5}/_{8}$ m-NaCl-Lösung, denn sonst konnte das Ei kein Wasser verlieren. Andererseits durfte das spezifische Gewicht der Lösungen nicht so hoch sein, daß auch ein sehr starker Wasserverlust die Eier nicht zum Sinken bringen konnte. Es wurden deshalb Lösungen gewählt, die zwischen beiden Extremen lagen, beispielsweise 3 m Lösungen von NaCl (mit dem spezifischen Gewicht von 1,1303).

Es wurden nicht frisch befruchtete Eier benutzt, sondern Eier, die mindestens schon 3 Tage vorher befruchtet waren und einen Embryo mit Kreislauf besaßen. Ehe die Eier in die Reagensgläser gebracht wurden, wurden sie zweimal in destilliertem Wasser gewaschen.

II. Das spezifische Gewicht der Funduluseier.

Lösungen verschiedener Stoffe wurden hergestellt, um zu ermitteln, in welchen Lösungen die Eier sofort, d. h. in weniger als 5 Minuten zu Boden sinken. Um die Beobachtung zu erleichtern, wurden die Lösungen in Reagensgläser gebracht. Unter jeder Lösung der folgenden Tabelle ist die Dichtigkeit angegeben.

Die Eier von Fundulus

sinken sofort in	schwimmen in
$^{11}/_8$ m-NaCl d = 1,0580	$^{12}/_8$ m-NaCl d = 1,0634
$^{10}/_8$ m-KCl d = 1,0613	$^{12}/_8$ m-KCl d = 1,0739
$^{4}/_8$ m-$MgSO_4$ d = 1,0625	$^{6}/_8$ m-$MgSO_4$ d = 1,0945
$^{6}/_8$ m-$MgCl_2$ d = 1,0609	$^{8}/_8$ m-$MgCl_2$ d = 1,0819
0,4 m-Rohrzucker d = 1,05368	0,6 m-Rohrzucker d = 1,08911

Das spezifische Gewicht der Funduluseier ist also ein wenig niedriger als 1,0634. Die Lösungen, in die die Eier gebracht wurden, um zu ermitteln, wie rasch ihr spezifisches Gewicht zunimmt, hatten ein erheblich höheres spezifisches Gewicht, nämlich 3 m-NaCl (d = 1,1303), $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$ (d = 1,1233) oder $^{20}/_8$ m-$CaCl_2$ (d = 1,2641) usf.

III. Die Entwicklung und Änderung des spezifischen Gewichtes der Funduluseier in Lösungen von (NaCl + KCl + $CaCl_2$) verschiedener Konzentration.

Die Mischungen von NaCl + KCl + $CaCl_2$ sind stets in dem Verhältnis hergestellt, in dem diese drei Salze im Seewasser enthalten sind, d. h. 100 Moleküle NaCl auf 2,2 Moleküle KCl und 1,5 Moleküle $CaCl_2$. Eine solche Lösung ist eine physiologisch äquilibrierte Salzlösung, da die Giftwirkungen von KCl durch NaCl und $CaCl_2$ und die von NaCl durch KCl und $CaCl_2$ antagonisiert werden. Wir wollen nun zunächst zeigen, daß in Lösungen dieser Art von hohem osmotischen Druck die spezifische Undurchgängigkeit der Eihaut von Fundulus gar nicht oder nur langsam geändert wird.

Wenn man eine solche Mischung verschiedener Konzentration von $^1/_2$ bis $2^1/_2$ m herstellt und frisch befruchtete Eier in dieselben bringt, so findet man, daß dieselben sich bis zu Lösungen von $^{15}/_8$ m zu Embryonen entwickeln[1]). In Lösungen bis zu $^{11}/_8$ m schlüpften auch die Fische aus, und zwar ein um so größerer Prozentsatz, je geringer die Hypertonie der Lösung war. In Lösungen dieser drei Salze von $^{12}/_8$ m und darüber schlüpfte kein Fisch mehr aus.

Wie ich vor vielen Jahren zeigte, sind die Fischeier in den ersten 24 Stunden empfindlicher gegen hohe Konzentrationen als später, und zwar dürfte das daran liegen, daß später die Membran oder Micropyle undurchgängiger wird. Wenn man 3 Tage alte Fischeier in eine $2^1/_2$ m-Lösung von $NaCl + KCl + CaCl_2$ bringt, so bleiben dieselben eine Reihe von Tagen, manchmal 11 Tage und darüber, am Leben. Die Zirkulation bleibt während dieser Zeit im schönsten Gange.

Auch in destilliertem Wasser entwickeln sich die Eier vollständig und schlüpfen aus. Es wurden nun Eier, die sich 2 Tage lang in destilliertem Wasser befunden hatten, plötzlich in eine $2^1/_2$ m-Lösung von $NaCl + KCl + CaCl_2$ gebracht. Die Embryonen lebten nahezu ebenso lange in dieser Lösung, wie die aus Seewasser übertragenen.

Diese und ähnliche Beobachtungen lassen sich unter folgenden zwei Voraussetzungen verstehen. 1. Bei Konzentrationen von Null bis etwa $^8/_8$ m oder allenfalls $^{10}/_8$ m-$NaCl + KCl + CaCl_2$ ist die Eihaut von Fundulus praktisch undurchgängig für Wasser und die in der Lösung ($NaCl + KCl + CaCl_2$) sowie die in dem Embryo enthaltenen Salze. 2. Bei höheren Konzentrationen wirkt diese Lösung langsam schädigend auf die Eihaut, wodurch dieselbe ihre Undurchgängigkeit für Wasser und Salze allmählich einbüßt, und zwar um so rascher, je höher die Konzentration der Lösung ist.

Um nun diese Ansicht zu prüfen, wurden die Eier in eine Reihe von Reagensgläsern mit folgenden Lösungen von $NaCl + KCl + CaCl_2$ gebracht: $^{10}/_8$, $^{11}/_8$, $^{12}/_8$, $^{13}/_8$, $^{14}/_8$, $^{15}/_8$, $^{16}/_8$, $^{18}/_8$ und $^{20}/_8$ m. In jedes Reagensglas wurden dann je

[1]) Der osmotische Druck des Seewassers in Woods Hole liegt zwischen dem einer $^1/_2$ und $^5/_8$ m-Lösung von $NaCl + KCl + CaCl_2$.

vier Funduluseier derselben Kultur gebracht, die neun Tage vorher befruchtet waren und alle einen lebenden Embryo hatten. In der $^{10}/_8$ m-Lösung sanken die Eier sofort, in den übrigen blieben sie zunächst an der Oberfläche. Es war nun die Absicht, herauszufinden, wie lange die Eier oben schweben würden. Tabelle I gibt die Zahl der oben schwimmenden Eier nach verschiedenen Intervallen an.

Tabelle I.

Nach Tagen	Zahl der oben schwimmenden Eier in $^{10}/_8$	$^{11}/_8$	$^{12}/_8$	$^{13}/_8$	$^{14}/_8$	$^{15}/_8$	$^{16}/_8$	$^{18}/_8$	$^{20}/_8$ m $NaCl + KCl + CaCl_2$
1	0	1	2	4	4	3	4	3	3
2		0	1	3	4	3	4	3	3
3			0	0	3	2	4	3	3
4					1	1	4	1	3
5					0	0	1	0	3

Eine Untersuchung der Eier, die am Boden lagen, ergab eine Schrumpfung des Dotters, die um so beträchtlicher war, je höher die Konzentration der Lösung. Die Eier waren aber am 5. Tage praktisch alle am Leben und die Zirkulation noch im schönsten Gange. Es kann also eine Schrumpfung und ein Sinken der Eier stattfinden, ohne daß die Eier absterben. Diese Tatsache muß im Hinblick auf die später zu erwähnenden Beobachtungen hier betont werden.

Aus diesen Versuchen dürfen wir schließen, daß in der Tat in hypertonischen Lösungen von $NaCl + KCl + CaCl_2$ bis zu $^{20}/_8$ m die spezifische Undurchgängigkeit der Eier von Fundulus eine Reihe von Tagen erhalten bleibt.

Es wurden nun Versuche mit Lösungen derselben Art, aber höherer Konzentrationen angestellt, nämlich mit 3, 4 und 5 m-Lösungen von $NaCl + KCl + CaCl_2$ in dem Verhältnis, in dem diese Salze im Seewasser enthalten sind. In der 5 m-Lösung sanken zwei Eier bereits nach 2 Stunden und die beiden anderen kurz darauf. In allen Eiern in dieser Lösung war nach 2 Stunden der Dotter stark geschrumpft. Die Eier in 4 m-($NaCl + KCl + CaCl_2$) sanken erheblich langsamer, zwei Eier erst nach 24 Stunden. Die Eier in 3 m-($NaCl + KCl + CaCl_2$) lebten aber fast ebenso lange und schwammen nahezu ebenso lange

an der Oberfläche wie in einer $2^1/_2$ m-($NaCl + KCl + CaCl_2$), d. h. 3 Tage oder länger.

Obwohl also eine 5 m-Lösung ein viel höheres spezifisches Gewicht besitzt als eine 3 m-Lösung, sinken die Eier doch in der 5 m-Lösung in wenig über 2 Stunden, während sie in der 3 m-Lösung 3 Tage oder länger an der Oberfläche schwimmen. Wir müssen daraus den Schluß ziehen, daß eine 5 m-Lösung von $NaCl + KCl + CaCl_2$ die Durchgängigkeit der Eimembran rasch erhöht und daß infolgedessen Wasser aus dem Ei austritt und vielleicht etwas Salz eintritt. Was bei dieser kritischen Konzentration rasch geschieht, geschieht bei niedrigen Konzentrationen derselben Mischung ebenfalls, aber langsamer.

Wir wollen nun zeigen, daß eine physiologisch nicht äquilibrierte Lösung die Durchgängigkeit der Membran schon bei relativ niedriger Konzentration rasch erhöht.

IV. Die Änderung des spezifischen Gewichtes der Eier in reinen NaCl-Lösungen verschiedener Konzentration.

Die hier zu beschreibenden Versuche waren gleichzeitig und mit demselben Material angestellt, das auch zu den vorigen Versuchen benutzt wurde. Es wurden $^{10}/_8$ bis $^{20}/_8$ m-NaCl-Lösungen in verschiedene Reagensgläser und in jedes Reagensglas vier Funduluseier gebracht. In den $^{10}/_8$ und $^{11}/_8$ m-NaCl-Lösungen sanken die Eier sofort, weil natürlicherweise ihr spezifisches Gewicht etwas größer ist als das einer $^{11}/_8$ m-NaCl-Lösung.

Tabelle II.

Nach Minuten	Zahl der oben schwimmenden Eier in								
	$^{10}/_8$	$^{11}/_8$	$^{12}/_8$	$^{13}/_8$	$^{14}/_8$	$^{15}/_8$	$^{16}/_8$	$^{18}/_9$	$^{20}/_8$ m-NaCl
2	0	2	4	4	4	4	4	4	4
3		0	3	4	4	4	4	4	4
64			2	3	4	4	4	4	3
139			2	3	4	4	4	1	1
240			0	2	3	2	1	0	0
480				2	1	0	1	0	0

Am nächsten Morgen waren alle Eier unten.

Es wurde nun ein Versuch mit 5, 4 und 3 m-NaCl angestellt. In 2 Stunden waren die Eier in 5 und 4 m-NaCl

alle zu Boden gesunken, die in 3 m-NaCl noch nicht, aber die Dotter waren bereits geschrumpft und die Embryonen waren tot (das Herz stand still). Nach ähnlichen Versuchen dürfen wir schließen, daß die Eier kurz darauf zu Boden sanken, obwohl die Untersuchung hier ein paar Stunden unterbrochen wurde. Als die Eier in 3 m-NaCl wieder beobachtet wurden, lagen sie am Boden.

Wir sehen also, daß schon eine relativ niedrige Konzentration von NaCl die Durchgängigkeit der Eihaut sehr rasch erhöht. Wir sehen ferner, daß in den höheren Konzentrationen von NaCl die Eier trotz des höheren spezifischen Gewichtes der Lösung rascher sinken als in der niedrigen Konzentration. In Tabelle II sinken die Eier in einer $^{20}/_8$ m-NaCl-Lösung alle in weniger als 4 Stunden, während in der $^{13}/_8$ m-NaCl-Lösung noch zwei Eier nach 8 Stunden schwimmen. Nirgends aber schwimmt ein Ei 24 Stunden lang. Dem Sinken ging wie immer ein Schrumpfen des Dottersackes voraus. Es fand also sicher ein Austritt von Wasser aus der Eihaut statt. Während aber in einer $^{20}/_8$ m-Lösung von NaCl + KCl + $CaCl_2$ der zum Sinken erforderliche Austritt von Wasser in etwa 3 bis 5 Tagen stattfindet, findet derselbe in der $^{20}/_8$ m-NaCl-Lösung in ebenso viel Stunden oder noch weniger statt. Dieser Unterschied in der Geschwindigkeit des Wasseraustrittes in der physiologisch äquilibrierten Lösung (NaCl + KCl + $CaCl_2$) und in der nicht äquilibrierten Lösung (NaCl) kann nur darauf beruhen, daß die reine NaCl-Lösung die natürlicherweise für Wasser fast undurchgängige Eimembran für Wasser rasch durchgängig macht, während diese Erhöhung der Durchgängigkeit in der physiologisch äquilibrierten Lösung nur langsam eintritt.

Während nun in den Lösungen von NaCl + KCl + $CaCl_2$ der Embryo meist noch am Leben ist, wenn die Eier schon sinken, ist in den reinen NaCl-Lösungen das umgekehrte der Fall; die Embryonen sterben meist schon, ehe der Dotter so weit geschrumpft ist, daß das Ei sinkt. Dieser Unterschied findet m. E. seine Erklärung darin, daß nicht nur die Durchgängigkeit der Membran für Wasser erhöht wird, sondern, wenn auch in geringerem Grade, diejenige für Salze. Wenn nun die reine NaCl-Lösung in das Ei eindringt, so tötet das den Embryo natürlich rascher, als wenn NaCl + KCl + $CaCl_2$ eintritt.

Wir verstehen auch aus diesen Versuchen, warum allgemein Lösungen hoher Konzentration Cytolyse der Zellen verursachen. Über eine gewisse Konzentration hinaus zerstört eben jede Lösung die spezifische Permeabilität einer Membran, und zwar um so rascher, je höher die Konzentration.

V. Die Änderung des spezifischen Gewichtes der Eier von Fundulus in Lösungen von $CaCl_2$.

Die Versuche mit $CaCl_2$ gaben ein ganz unerwartetes Resultat: Die befruchteten Eier fingen in den Lösungen von höherem spezifischen Gewicht schon in etwa $^1/_2$ Stunde an zu sinken. Eier, die vor drei Tagen befruchtet waren, wurden in $^6/_8$, $^8/_8$, $^{10}/_8$, $^{12}/_8$, $^{14}/_8$, $^{16}/_8$, $^{18}/_8$ und $^{20}/_8$ m-Lösungen von $CaCl_2$ gebracht. In einer $^m/_2$-$CaCl_2$-Lösung sinken alle Eier sofort; in einer $^6/_8$ m-Lösung sinken einige, während andere schwimmen; in den stärker konzentrierten Lösungen schwammen sie an der Oberfläche. Nach 25 Minuten beginnen die ersten Eier zu sinken[1]), und 6 Minuten später sind die Eier in allen Gefäßen im Sinken oder am Boden. Obwohl der Vorgang sehr rasch verläuft, kann man doch feststellen, daß in den niedrigen Konzentrationen von $CaCl_2$, nämlich $^8/_8$, $^{10}/_8$ und $^{12}/_8$ m die Eier ein wenig später zu sinken beginnen als in den stärker konzentrierten Lösungen.

Verfolgt man nun das Verhalten eines 8 Tage alten Embryos unter dem Mikroskop, während derselbe einer $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$-Lösung ausgesetzt ist, so beobachtet man, daß sich fast sofort Dellen in der Eimembran bilden (was auf einen Flüssigkeitsaustritt hinweist); diese Dellen können aber später wieder verschwinden. Der Embryo macht plötzlich sehr lebhafte Bewegungen, die auf ein Eindringen von $CaCl_2$ in das Ei hinweisen. In etwa 10 bis 15 Minuten hört schon die Zirkulation und bald auch der Herzschlag auf. Inzwischen hat auch die Schrumpfung des Dotters begonnen, die nun rasch weiterschreitet. Wir müssen daraus schließen, daß hypertonische

---

[1]) Es sei hier bemerkt, daß der Zeitpunkt, in dem das Ei ein größeres spezifisches Gewicht erreicht als die Lösung, in der es sich befindet, oft dadurch der Aufmerksamkeit entgeht, daß die Oberflächenspannung das Ei am Sinken hindert. Deshalb ist es nötig, von Zeit zu Zeit die Reagensgläser leicht zu schütteln.

Lösungen von $CaCl_2$ die Eihaut in wenigen Minuten durchgängig machen, daß infolgedessen Wasser aus dem Ei tritt, wodurch der Dotter zum Schrumpfen kommt, und daß etwas $CaCl_2$ in das Ei tritt und den Embryo rasch tötet. Die Erfahrung, daß $CaCl_2$ schon in so niedriger Konzentration die Durchlässigkeit der Eihaut so rasch erhöht, ist überraschend im Hinblick auf die Erfahrungen der Botaniker. Ich vermute aber, daß die Aussagen der letzteren sich auf $CaCl_2$-Lösungen geringerer Konzentration beziehen. Ich habe ja schon in einer früheren Arbeit darauf hingewiesen, daß $CaCl_2$ in niedrigerer Konzentration die entgegengesetzte Wirkung hat, welche ihm in höheren Konzentrationen zukommt; in niedrigen Konzentrationen verringert es die Durchgängigkeit, während es in höheren Konzentrationen dieselbe erhöht[1]).

VI. Beweis, daß die antagonistische Salzwirkung auf der Erhaltung der spezifischen Durchlässigkeit der Eihaut beruht.

In früheren Arbeiten habe ich gezeigt, daß, wenn wir frisch befruchtete Eier von Fundulus in eine $^5/_8$ m-NaCl-Lösung bringen, das Ei so rasch getötet wird, daß kein Embryo gebildet wird; daß, wenn wir aber eine sehr kleine, aber bestimmte Menge eines Erdalkalisalzes zusetzen, alle Eier Embryonen bilden. Wir wollen nun zeigen, daß der Zusatz eines solchen Salzes zu einer NaCl-Lösung die Erhöhung der Durchgängigkeit der Eihaut hemmt, die durch das NaCl allein herbeigeführt wird.

Wir stellen folgenden Versuch an, den ich vielen Besuchern gezeigt habe und der ein nie versagender Demonstrationsversuch ist. Drei Lösungen werden in drei Reagensgläser *a*, *b* und *c* verteilt. In *a* befindet sich eine 3 m-NaCl-Lösung, in *b* eine $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$-Lösung, und in *c* eine Mischung von 48 ccm 3 m-NaCl + 2 ccm $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$. In jedes Reagensglas kommen 4 Eier von Fundulus, welche etwa 3 bis 10 Tage vorher befruchtet waren. Zunächst schwimmen die Eier in allen 3 Gefäßen an der Oberfläche. In 30 Minuten sind alle 4 Eier in *b* ($^{10}/_8$ m-$CaCl_2$) am Boden; die Dotter der Eier sind stark geschrumpft, die Embryonen tot. Nach wenigen Stunden

---

[1]) Diese Zeitschr. **39**, 194, 1912.

(etwa 3 in der Regel) sind in *a* (3 m-NaCl) alle 4 Embryonen tot und die Dotter geschrumpft, und die Eier sind am Boden. In *c* (48 ccm 3 m-NaCl + 2 ccm $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$) sind alle 4 Eier noch nach 3 bis 4 Tagen am Leben und an der Oberfläche. Nach 3 Tagen ist oft noch keine Schrumpfung dieser Eier bemerklich und die Herztätigkeit und die Zirkulation sind noch im Gange. Also bei den Eiern, die sich in der physiologisch äquilibrierten Lösung (48 ccm 3 m-NaCl + 2 ccm $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$) befinden, tritt die Erhöhung des spezifischen Gewichts, die zum Sinken führt, erst nach etwa 3 bis 4 oder allenfalls 5 Tagen ein, während sie in der $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$-Lösung nach 30 Minuten, in der 3 m-NaCl-Lösung in etwa 90 bis 180 Minuten eintritt.

Wir sehen also, daß in diesem Versuch sowohl die $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$-Lösung als auch die 3 m-NaCl-Lösung jede für sich den Embryo rasch tötet und den Dottersack in weniger als 1 resp. 3 Stunden zum Schrumpfen und damit das Ei zum Sinken veranlaßt, während die Mischung beider Lösungen im Verhältnis von 25 ccm 3 m-NaCl + 1 ccm $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$ die Embryonen am Leben erhält, und das Schrumpfen des Dottersackes und damit das Sinken der Eier verhindert.

Hier ist nun anscheinend eine Schwierigkeit vorhanden, nämlich, daß eine $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$-Lösung allein die Durchlässigkeit rascher erhöht als eine 3 m-NaCl-Lösung, und daß trotzdem der Zusatz von einer kleinen Menge von $CaCl_2$ zu NaCl die Durchgängigkeitserhöhung hindert, welche das NaCl allein hervorrufen würde. Ich glaube, daß dieser scheinbare Widerspruch seine Erledigung findet in der Tatsache, auf die ich schon früher hingewiesen habe, daß $CaCl_2$ in niedriger Konzentration eine schützende Wirkung ausübt, während es in höherer Konzentration die Membran schädigt. Wenn wir 1 ccm $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$ zu 24 ccm 3 m-NaCl zufügen, so ist die Konzentration des $CaCl_2$ in der Mischung $^{m}/_{20}$. In dieser Konzentration hat das $CaCl_2$ aber nur eine schützende Wirkung auf die Membran. Die Tatsache, daß die schädliche Wirkung einer Salzlösung auf die Membran eine Funktion der Konzentration ist, wird ja in all diesen Versuchen klar.

Wir wollen nun zeigen, daß auch die Salze der anderen Erdalkalimetalle, $SrCl_2$, $MgCl_2$ und $BaCl_2$, die das NaCl zu ent-

giften imstande sind, auch die Durchlässigkeitserhöhung der Eihaut durch NaCl hemmen.

Es wurden je 4 Eier (9 Tage nach der Befruchtung) in $SrCl_2$ verschiedener Konzentration gebracht. In einer $^2/_8$ m-$SrCl_2$-Lösung sinken die Eier sofort, in Lösungen von $^4/_8$ m und darüber schwimmen dieselben an der Oberfläche.

Tabelle III.

Nach	Zahl der oben schwimmenden Eier in								
	$^4/_8$	$^6/_8$	$^8/_8$	$^{10}/_8$	$^{12}/_8$	$^{14}/_8$	$^{16}/_8$	$^{18}/_8$	$^{20}/_8$ m-$SrCl_2$
1 Stunde	4	4	4	4	2	0	0	1	4
3 Stunden	4	4	0	0	0			0	2
22 „	4	0							0

Die Eier beginnen in den Lösungen höherer Konzentration rascher zu sinken als in den niedrigeren Konzentrationen, was wohl darauf hinweist, daß die Verringerung der Durchlässigkeit der Eihaut um so rascher eintritt, je höher die Konzentration ist. Daß die $^{18}/_8$ und $^{20}/_8$ m-Lösungen eine scheinbare Ausnahme bilden, ist nur durch das hohe spezifische Gewicht dieser Lösungen bedingt. Die Eier waren nämlich stark geschrumpft. Es ist beachtenswert, daß eine $^4/_8$ m-Lösung von $SrCl_2$ das Ei weniger rasch tötet als eine $^4/_8$ m-$CaCl_2$-Lösung. Es wurde nun untersucht, ob der Zusatz von $SrCl_2$ zu einer 3 m-NaCl-Lösung das Sinken der Eier in dieser Lösung zu hemmen imstande sei. Zu dem Zwecke wurden in eine Reihe von Reagensgläsern die in der folgenden Tabelle angegebenen Mischungen von 3 m-NaCl und $^{10}/_8$ m-$SrCl_2$ gebracht und zu jeder Lösung 4 Eier zugesetzt.

Tabelle IV.

Nach	Zahl der oben schwimmenden Eier in 50 ccm 3 m-NaCl +						
	0	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2
	ccm $^{10}/_8$ m-$SrCl_2$						
2 Stunden	2	3	3	4	4	4	4
4 „ 50 Min.	0	0	3	3	4	4	4
22 „			0	0	1	3	4
2 Tagen					0	2	4
3 „						2	4
4 „						0	
5 „							

Man sieht also, daß der Zusatz von 3,2 ccm $^{10}/_8$ m-$SrCl_2$ zu 50 ccm 3 m-NaCl die schädigende Wirkung der letzteren Lösung auf die Eihaut fast in demselben Maße vermindert, wie der Zusatz von $CaCl_2$. Wie im Falle von $CaCl_2$ besteht auch hier die schützende Wirkung von $SrCl_2$ darin, daß seine Gegenwart die Erhöhung der Durchlässigkeit der Eihaut für Wasser und Salze, die durch 3 m-NaCl rasch herbeigeführt würde, hemmt.

In den früheren Versuchen über die Hemmung der Giftwirkung einer reinen NaCl-Lösung auf Fische durch die Salze zweiwertiger Kationen zeigte es sich, daß die entgiftende Wirkung von $CaCl_2$ und $SrCl_2$ nahezu gleich war, daß aber die von $MgCl_2$ und besonders von $BaCl_2$ erheblich geringer war. Es wurde untersucht ob sich ein ähnlicher Unterschied auch in den Versuchen über die Erhöhung des spezifischen Gewichtes der Eier nachweisen ließe.

Bringt man die Eier in $MgCl_2$-Lösungen von verschiedener Konzentration, so benehmen sie sich ähnlich wie in den $CaCl_2$-Lösungen. Je vier Eier wurden in $^2/_8$, $^4/_8$, $^6/_8$, $^8/_8$, $^{10}/_8$, $^{12}/_8$, $^{14}/_8$, $^{16}/_8$ und $^{20}/_8$ m-$MgCl_2$ gebracht. In $^2/_8$ und $^4/_8$ m-$MgCl_2$ sinken die Eier sofort und rasch, da ihr spezifisches Gewicht größer ist als das der Lösung. In $^6/_8$ m-$MgCl_2$ sinken sie etwas langsamer; das spezifische Gewicht dieser Lösung ist 1,0609, und das ist nur wenig geringer als das spezifische Gewicht der Eier. In den Lösungen höherer Konzentration schwimmen sie an der Oberfläche. Nach etwa 30 Minuten fangen die Eier an in allen Lösungen zu Boden zu sinken, zuletzt in der $^{10}/_8$ m und $^8/_8$ m-Lösung, in denen sie etwas länger als 30 Minuten an der Oberfläche bleiben können. Dem Sinken geht in diesem Falle wie immer in Lösungen von höherem spezifischen Gewicht eine Schrumpfung des Dotters vorauf; außerdem starben die Embryonen in diesem Versuche auch rasch. $MgBr_2$ wirkt ähnlich wie $MgCl_2$. In einer Versuchsreihe wurden zu 50 ccm 3 m-NaCl verschiedene Mengen einer $^{10}/_8$ m-$MgBr_2$-Lösung zugesetzt und je vier Eier in ein Reagensglas gebracht.

Während also in den 3 m-NaCl-Lösungen die Eier schon in den ersten 3 Stunden oder weniger sanken, genügte der Zusatz von 3,2 ccm $^{10}/_8$ m-$MgBr_2$, einen Teil der Eier 6 bis

Tabelle V.

Nach	Zahl der oben schwimmenden Eier in 50 ccm 3 m-NaCl +								
	0	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4	12,8 ccm $^{10}/_{8}$-$MgBr_2$
70 Minuten	1	4	4	4	4	4	4	4	4
195 „	0	0	0	0	4	4	4	4	4
6 Stunden					0	0	2	4	1
23 „							0	2	1
2 Tagen								0	0

22 Stunden vor dem Sinken zu bewahren. Die Schutzwirkung von $MgBr_2$ ist also, wie zu erwarten, geringer als die von $CaCl_2$ und $SrCl_2$. Bringt man Fundulus-Eier in Lösungen von $BaCl_2$ mit höherem spezifischen Gewicht als das der Eier, so fangen nach einiger Zeit die Eier an zu sinken. Lösungen von 0,4 m-$BaCl_2$ und darüber haben ein höheres spezifisches Gewicht als die Eier. Je vier Eier wurden in die $BaCl_2$-Lösungen der Tabelle VI gebracht.

Tabelle VI.

Nach Minuten	Zahl der oben schwimmenden Eier in					
	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9 m-$BaCl_2$
60	4	4	4	3	2	1
94	4	4	3	1	1	0
150	3	2	1	0	0	
235	1	1	0			
355	1	0				

Der Versuch wurde ausführlich mitgeteilt, weil derselbe besser als die bisherigen Versuche die Tatsache zum Ausdruck bringt, daß die höher konzentrierten Lösungen die Erhöhung der Permeabilität der Membran schneller bewirken als Lösungen niedriger Konzentration. Darauf beruht es wohl, daß für dieses Ei für jede Lösung eine Grenzkonzentration gefunden werden kann, unterhalb deren das Fundulusei beliebig lange lebt, weil die Lösung unterhalb dieser Konzentration nicht imstande ist, die Durchgängigkeit der Membran über den kritischen Wert zu erhöhen.

Daß nun der Zusatz von etwas $BaCl_2$ auch das Sinken der Eier in einer 3 m-NaCl-Lösung hemmen kann, wird im folgenden Versuch gezeigt. Wie immer wurden je vier Eier

in ein Reagensglas mit der Lösung gebracht. Die Eier waren vor 7 Tagen befruchtet.

Tabelle VII.

Nach	Zahl der oben schwimmenden Eier in 100 ccm 3 m-NaCl +									
	0	0,1	0,2	0,4	1,2	1,6	4,0	8,0	16,0	32,0 m-$BaCl_2$
180 Minuten	0	0	4	4	4	4	4	4	3	3
290 „			0	4	4	3	4	4	1	1
$6^1/_2$ Stunden				1	1	2	4	1	1	0
10 „				0	1	0	1	0	0	

Der Zusatz von 4,0 m-$BaCl_2$ zu 100 ccm 3 m-NaCl verzögert die Erhöhung der Durchlässigkeit der Eimembran, die die 3 m-NaCl-Lösung an sich bewirkt, ganz erheblich.

Diese Versuche beweisen, daß die Entgiftung einer reinen NaCl-Lösung durch eine kleine Menge eines Erdalkalisalzes beim Fundulusei in der Tat in erster Linie darauf beruht, daß das Erdalkalisalz die Erhöhung der Permeabilität der Eihaut hemmt, die durch die NaCl-Lösung hervorgebracht wird.

Damals wurde gefunden, daß nicht nur die Salze von Mg, Ca, Sr und Ba, die giftige Wirkung einer $^5/_8$ m-NaCl-Lösung oder einer Lösung eines Salzes mit einwertigem Metall auf das frisch befruchtete Ei aufheben, sondern auch die Salze von Zn und Pb, u. a. Es wurde nun der Versuch gemacht, ob der Zusatz von etwas $ZnSO_4$ auch das Sinken der Eier in einer Lösung von 3 m-NaCl verzögern würde. Das Gegenteil war aber der Fall, der Zusatz von $ZnSO_4$ beschleunigte das Sinken der Eier in dieser Lösung.

Da die Lösung von $ZnSO_4$ sauer ist, so lag es nahe, dieses Verhalten der Lösung der Säure zuzuschreiben. Es wurden deshalb einer 3 m-NaCl-Lösung verschiedene Mengen $^n/_{10}$-HCl zugesetzt. Es stellte sich heraus, daß der Zusatz selbst sehr kleiner Mengen von Säure zu der 3 m-NaCl-Lösung das Sinken der Eier in der Lösung beschleunigte. Da wir später eingehend die Wirkung von Säure auf die Durchgängigkeit der Eihaut besprechen, so wollen wir von der Mitteilung von Zahlenbeispielen absehen.

Es entsteht aber dann die Frage, wie es zu erklären ist, daß in den früheren Versuchen der Zusatz von etwas $ZnSO_4$ die schädliche Wirkung der reinen NaCl-Lösung aufhob. Das

dürfte wohl daran liegen, daß wir damals nicht mit 3 m-NaCl, sondern mit $^5/_8$ m-NaCl arbeiteten. Wenn wir nun dieser letzteren NaCl-Lösung $ZnSO_4$ zusetzten, so hatten wir in Wirklichkeit folgendes System: $^5/_8$ m-NaCl — $^m/_{80}$-$ZnSO_4$ — niedrige Konzentration HCl. Die $^5/_8$ m-NaCl-Lösung wirkte antagonistisch auf die Säure; und Zn wirkte antagonistisch auf $^5/_8$-m-NaCl; und möglicherweise wirkte NaCl entgiftend auf $ZnSO_4$. Nun fanden Wasteneys und ich, daß Salzlösungen nur so lange Fundulus gegen Säure schützen, als die Konzentration der Salzlösung die Grenze der Isotonie nicht übersteigt. Steigt die Konzentration der Salzlösung über $^m/_2$, so nimmt die schützende Wirkung derselben gegen Säure rasch ab[1]). In meiner neuen Versuchsreihe war die Konzentration der NaCl-Lösung 3 m. Eine solche Lösung wirkt nicht länger antagonistisch auf Säure, sondern, im Gegenteil, durch Säurezusatz wird die schädliche Wirkung der 3 m-NaCl-Lösung auf die Eihaut beschleunigt.

Es wurden weiter Versuche angestellt, ob es auch gelingt, das Sinken der Eier in einer 4 m-NaCl-Lösung durch Zusatz von Salzen mit zweiwertigem Metall zu hemmen. Das war wohl der Fall, aber es gelang, wie zu erwarten, nicht so gut wie im Falle einer 3 m-Lösung von NaCl. So sanken in einem Versuch in 50 ccm 4 m-NaCl die Eier in weniger als 2 Stunden, während dieselben in 50 ccm 4 m-NaCl + 1 ccm $2^1/_2$ m-$CaCl_2$ noch nach 5 Stunden alle oben waren. Nach 17 Stunden, und wahrscheinlich schon früher, waren sie aber auch alle am Boden.

Wie NaCl, verhält sich auch LiCl und KCl. Es würde zu weit führen, alle diese Versuche hier anzuführen, aber ein KCl-Versuch möge erwähnt werden, weil er das Eindringen des Salzes in schöner Weise zeigt. Je vier Eier wurden in folgende Lösungen gebracht: 50 ccm $^{12}/_8$ m-KCl + 0, 0,8, 1,6, 3,2 ccm $^{10}/_8$-$CaCl_2$. In allen stockte der Herzschlag in weniger als 30 Minuten, ein Beweis, daß etwas KCl eingedrungen war. Aber während am nächsten Morgen die Eier in $^{12}/_8$ m-KCl alle am Boden waren, befanden sich in den calciumhaltigen $^{12}/_8$ m-KCl-Lösungen noch je zwei Eier an der Oberfläche. Der

---

[1]) Diese Zeitschr. 39, 167, 1912.

Versuch beweist, daß die Wasserabgabe aus dem Ei durch die Gegenwart von Ca mehr verlangsamt wird, als das Eindringen des KCl in das Ei.

Wir besitzen mithin in den neuen Versuchen über die Änderung des spezifischen Gewichtes der Eier einen direkten Beweis, daß die Aufhebung der Giftwirkung einer Lösung eines Salzes mit einwertigem Metall (z. B. NaCl) durch Zusatz einer kleinen Menge eines Salzes mit zweiwertigem Metall (z. B. $CaCl_2$) darauf beruht, daß das $CaCl_2$ die Erhöhung der Durchlässigkeit der Eihaut hemmt, die das NaCl in hinreichender Konzentration hervorruft. In einer Mischung von NaCl und $CaCl_2$ (in richtigem Verhältnis) bleibt die Membran für Wasser und Salze relativ lange undurchgängig.

VII. Über eine verbesserte Methode zur Messung der Erhöhung der Durchlässigkeit.

Es ist für die weitere Ausarbeitung dieses Gebietes sehr wichtig, daß sich die Erhöhung der Durchlässigkeit der Membran durch eine Lösung messend verfolgen läßt. Zu dem Zweck läßt sich die folgende Methode benutzen. Man nimmt Eier einer Kultur und setzt sie verschieden lange der Einwirkung einer Lösung aus, welche die Durchgängigkeit der Membran erhöht, z. B. $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$. Dann werden die Eier immer in dieselbe hypertonische äquilibrierte Lösung gebracht, in der sie normalerweise lange schwimmen. Es wird dann gemessen, wie rasch sie in dieser Lösung zu Boden sinken. Wir benutzten als eine solche physiologisch äquilibrierte Probelösung eine Mischung von 50 ccm 3 m-NaCl + 1 ccm $2\,^1/_2$ m-$CaCl_2$. In einer solchen Lösung schwimmen normale Eier etwa 3 Tage lang. (Diese Lösung soll nun kurz im folgenden als die Probelösung bezeichnet werden.)

Eier, die 7 Tage vorher befruchtet worden waren, wurden zweimal in destilliertem Wasser gewaschen und dann in $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$ gebracht. Eine Portion der Eier wurde unter dem Mikroskop in der Lösung beobachtet. Nach 12 Minuten stand bei der Hälfte der Embryonen bereits das Herz still und 2 Minuten später stand bei allen das Herz still. Um diese Zeit war die Schrumpfung des Dotters noch sehr gering, dieselbe schritt aber rasch vor. Nach 23 Minuten begannen die

Eier zu Boden zu sinken. 1, 2, 3, 4, $7^1/_2$ und 10 Minuten, nachdem die Eier in die $^{10}/_8$ m-Lösung von $CaCl_2$ übertragen waren, wurden je 4 derselben in die Lösung von 50 ccm 3 m-NaCl + 1 ccm $2^1/_2$ m-$CaCl_2$ übertragen. Vier nicht mit $CaCl_2$ behandelte Eier wurden zur Kontrolle ebenfalls in diese Lösung gebracht. Das Resultat gibt Tabelle VIII.

Tabelle VIII.

Nach	Zahl der in der Probelösung schwimmenden Eier. Vorbehandlung mit $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$						
	0	1	2	3	4	$7^1/_2$	10 Min.
85 Minuten	4	4	4	1	0	0	0
$4^1/_2$ Stunden	4	3	2	0			
17 Stunden	4	2	0				

Dieser Versuch zeigt, daß bereits ein Aufenthalt der Eier von wenigen Minuten in $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$ die normale Undurchgängigkeit ihrer Membranen fast völlig beseitigt. Die Eier schwimmen in einer Lösung von 50 ccm 3 m-NaCl + 1 ccm $2^1/_2$ m-$CaCl_2$ mehrere Tage, weil sie relativ undurchgängig für Wasser und Salze sind und diese Lösung ihre Undurchgängigkeit nur sehr langsam verringert. Bringt man sie aber nur 4 Minuten in eine $^{10}/_8$ m-NaCl-Lösung, so sinken sie hinterher in einer 3 m-NaCl + $CaCl_2$-Lösung schon in weniger als 85 Minuten alle zu Boden. Ein Aufenthalt von 4 Minuten in der $CaCl_2$-Lösung bringt aber keine äußerlich wahrnehmbare Veränderung bei den Eiern hervor, und sie entwickeln sich normal, wenn man sie nach dieser Zeit in Seewasser zurückbringt. Selbst ein Aufenthalt von 2 oder sogar 1 Minute in der reinen $^{10}/_8$ m-CaCl-Lösung erhöht die Durchgängigkeit der Eier schon merklich.

In einer 3 m-NaCl-Lösung sinken die Eier ebenfalls in $1^1/_2$ bis 3 Stunden. Nach unserer Annahme muß dem Sinken der Eier eine Erhöhung der Durchgängigkeit ihrer Membran voraufgehen. Da aber das Sinken der Eier in einer 3 m-NaCl-Lösung langsamer erfolgt als in einer $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$-Lösung, so muß auch die Erhöhung der Durchgängigkeit langsamer erfolgen. Eier, die vorher in destilliertem Wasser gewaschen waren, wurden in eine 3 m-Lösung von NaCl gebracht und

nach verschiedenen Intervallen wurden je 4 Eier von hier in Reagensgläser mit 50 ccm 3 m-NaCl + 1 ccm $2^1/_2$ m-$CaCl_2$ übertragen. Tabelle IX gibt das Resultat.

Tabelle IX.

Nach	Zahl der in der Probelösung schwimmenden Eier. Vorbehandlung in 3 m-NaCl von						
	0	11	21	41	62	74	88 Min.
2 Stunden	4	4	4	4	3	3	2
5 „ 20 Min.	4	4	4	3	0	2	1
7 „	4	3	3	2	0	2	0
24 „	4	2	1	1		1	

Man sieht, daß schon nach 60 Minuten die Durchgängigkeit der Eihaut in einer 3 m-NaCl-Lösung so stark erhöht wird, daß die Eier in einer Lösung von 50 ccm 3 m-NaCl + 1 ccm $2^1/_2$ m-$CaCl_2$, in der sie 3 Tage lang oben schwimmen sollten, schon nach 5 Stunden zu Boden sinken.

Als weiteres Beispiel möge die Wirkung von Kaliumoleat dienen. Eier wurden in $^m/_{100}$-Kaliumoleat gebracht. Nach 10 Minuten wurden die Embryonen sehr unruhig, ein Beweis für das Eindringen der Seife. Nach etwa 1 Stunde traten Störungen der Zirkulation auf. Nach verschiedenen Intervallen wurden Eier aus der Seifenlösung genommen, zweimal in H_2O gewaschen und dann in 50 ccm 3 m-NaCl + 1 ccm $2^1/_2$ m-$CaCl_2$ übertragen. Die nach 36 Minuten aus der Seifenlösung genommenen Eier besaßen bereits eine so große Durchlässigkeit der Eihaut, daß dieselben schon nach 2 Stunden in der Probelösung zu Boden sanken. Die nach 51 Minuten herausgenommenen Eier sanken schon erheblich früher zu Boden. Ebenso ließ sich die Erhöhung der Durchlässigkeit durch Natriumoxalat nachweisen.

Ich glaube, daß diese und ähnliche Versuche den Beweis liefern, daß die Eihaut von Fundulus im Seewasser als undurchgängig für Wasser und Salze angesehen werden darf; daß Lösungen von nur einem Salz die Membran durchgängig für Wasser und Salze machen und daß die Geschwindigkeit, mit der die Erhöhung der Durchgängigkeit eintritt, eine Funktion der Natur und Konzentration der Lösung ist. Damit ist auch das Wesen der antagonistischen Salzlösung aufgeklärt:

der Zusatz von 1 ccm $2^1/_2$ m-$CaCl_2$ verhindert die rasche Erhöhung der Durchgängigkeit der Eihaut, welche eine reine 3 m-NaCl-Lösung hervorbringen würde.

VIII. Die Bedeutung der Proteine für die Durchgängigkeit der Eihaut für Wasser und Salze.

Die weit verbreitete Annahme, daß die Lipoide der Zellmembran die Aufnahme und Abgabe von Stoffen durch die Zelle bestimmen, stößt auf die unüberwindliche Schwierigkeit, daß der Stoffaustausch der Zelle auf Wasser und wasserlösliche und nicht auf lipoidlösliche Stoffe eingestellt ist. Um dieser Schwierigkeit zu entgehen, haben Overton u. a. auf die Möglichkeit hingewiesen, daß für die Absorption von Wasser, Salzen und anderen lipoidunlöslichen Stoffen nicht die Diffusionskräfte, sondern ein noch unbekannter Mechanismus in Betracht komme. Ich habe schon früher darauf hingewiesen, daß es doch näher liegt, die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß die Absorption lipoidunlöslicher Stoffe überhaupt nichts mit den Lipoiden zu tun hat, sondern daß hierfür andere Stoffe, z. B. Eiweißkörper, in Betracht kommen[1]).

Die Möglichkeit, diese Ansicht zu prüfen, bot sich im Anschluß an Beobachtungen über die Entschwellung des Muskels unter dem Einfluß von Säure und Salzen, die ich im Jahre 1899 zuerst veröffentlicht habe[2]). Ich hatte gefunden, daß der Froschmuskel durch einen gewissen Säurezusatz in einer isotonischen NaCl-Lösung zum Schwellen gebracht wird; daß er ferner in einer neutralen, aber stark hypertonischen Lösung zwar zuerst Wasser verliert, schließlich aber Wasser aufnimmt und ebenfalls schwillt. Bringt man aber den Muskel in eine Mischung von hypertonischer Salzlösung und Säure, so tritt eine Entschwellung ein. Ich erwähnte schon damals die Möglichkeit, daß diese Erscheinung auf die Wirkung der Stoffe auf die Eiweißkörper des Muskels zurückzuführen sei. Diese Vermutung ist nun inzwischen durch die Versuche von Pauli und seinen Schülern, sowie von Prokter zur Gewißheit erhoben worden.

---

[1]) Science 34, 653, 1912.

[2]) Arch. f. d. ges. Physiol. 75, 308, 1899. Vorlesungen über die Dynamik der Lebenserscheinungen S. 77, 1906.

In den Arbeiten dieser Autoren über den Einfluß der Säuren auf die physikalischen Eigenschaften der Eiweißkörper zeigte es sich nämlich, daß das Anion der Säure von großem Einfluß ist, daß HCl beispielsweise viel wirksamer ist als H_2SO_4. Ich veranlaßte nun Herrn Dr. Beutner, festzustellen, welche Konzentration der Salzlösung erforderlich ist, um die schwellende Wirkung der Säure mit demselben Anion auf den Froschmuskel zu verhindern. Es zeigte sich, daß die entschwellende oder antagonistische Wirkung von Na_2SO_4 auf H_2SO_4 erheblich viel größer ist als die entschwellende Wirkung von NaCl auf HCl. „Bestimmt man diejenige Konzentration des Na_2SO_4, die in einer beispielsweise $^n/_{200}$-H_2SO_4-Lösung aufzuwenden ist, um nach ca. 24 Stunden weder Schwellung noch Entschwellung hervorzubringen, so findet man, daß dieselbe zwischen 0,01 und 0,02 mol. Na_2SO_4 liegt.“ Bestimmt man die Konzentration von NaCl, die nötig ist, um eine schwellende Wirkung von $^n/_{200}$-HCl zu hemmen, so findet man, daß dieselbe zwischen $^5/_{16}$ und $^6/_{16}$ m-NaCl liegt[1]). Die antagonistische Wirkung von Na_2SO_4 ist also für $^n/_{200}$-Säure mindestens 20 mal so groß wie die von NaCl. Hier handelt es sich um eine spezifische Eiweißreaktion.

Im folgenden wollen wir nun den Nachweis führen: erstens, daß Säure die Durchgängigkeit der Eihaut von Fundulus rasch erhöht; zweitens, daß diese Durchgängigkeitserhöhung durch Säure durch Salze gehemmt wird; drittens, daß diese antagonistische Wirkung für das System H_2SO_4—Na_2SO_4 viel größer ist als für das System HCl—NaCl.

Die Methode bestand darin, daß die Eier, nachdem sie zweimal in destilliertem Wasser gewaschen waren, in eine Säurelösung resp. Säure-Salzlösung gebracht wurden und nach verschiedenen Zeiten je 4 Eier herausgenommen, durch Waschen in Seewasser von der Säure befreit und dann in die Probelösung 50 ccm 3 m-NaCl + 1 ccm $2^1/_2$ m-$CaCl_2$ gebracht wurden. Wie erwähnt, schwimmen in dieser „Probelösung“ die normalen Eier etwa 3 Tage lang an der Oberfläche. Eine kurze Säurebehandlung erhöht aber die Durchgängigkeit der Eier sehr rasch.

---

[1]) Beutner, diese Zeitschr. 39, 280, 1912.

Eier von Fundulus, die mehrere Tage vorher befruchtet waren, wurden in eine $^{n}/_{1250}$-H_2SO_4-Lösung gebracht. Nach verschiedenen Intervallen wurden je 4 Eier in die Probelösung übertragen und festgestellt, wie lange sie oben schwammen.

Tabelle X.

Nach Stunden	Zahl der in der Probelösung oben schwimmender Eier. Vorbehandelt mit $^{n}/_{1250}$-H_2SO_4									
	4	8	12	16	20	25	31	37	48	60 Min.
2	4	4	3	1	3	2	2	0	0	0
$3^1/_2$	3	2	0	0	0	0	0			
$7^1/_2$	2	0								
23	0									

Gleichzeitig wurde ein Parallelversuch mit denselben Eiern in einer $^{n}/_{1250}$-H_2SO_4 + $^{m}/_{2}$-Na_2SO_4 angestellt; d. h. die $^{n}/_{1250}$-H_2SO_4-Lösung war mit einer $^{m}/_{2}$-Na_2SO_4-Lösung statt wie vorhin mit destilliertem Wasser angestellt. Wie die folgende Tabelle zeigt, tritt nunmehr die Erhöhung der Durchlässigkeit der Eihaut gar nicht oder nur in einem viel geringeren Grade ein.

Tabelle XI.

Nach	Zahl der in der Probelösung oben schwimmenden Eier. Vorbehandlung in $^{n}/_{1250}$-H_2SO_4 in $^{m}/_{2}$-Na_2SO_4 von									
	5	10	20	30	40	60	80	100	120	240 Min.
$7^1/_2$ Std.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
$23^1/_2$ „	3	3	3	2	3	4	2	1	1	1
2 Tagen	1	2	2	1	2	1	2	0	0	1
3 „	1	2	2	1	1	1	0			1

Während eine $^{n}/_{1250}$-H_2SO_4-Lösung ohne Na_2SO_4 die Durchgängigkeit der Eihaut schon nach 20 Minuten so weit erhöhte, daß die Eier in weniger als $3^1/_2$ Stunden in der Probelösung zu Boden sanken, hemmte die Gegenwart der $^{m}/_{2}$-Na_2SO_4-Lösung diese Säurewirkung so weit, daß nach einem Aufenthalt von 20 Minuten in der Säure-Salzlösung diese Eier z. B. noch nach 3 Tagen an der Oberfläche der Probelösung schwammen.

Es wurde nun eine Versuchsreihe mit der doppelten Konzentration von H_2SO_4 angestellt; wir lassen zunächst den Versuch in der reinen $^{n}/_{625}$-H_2SO_4 (ohne Salz) folgen.

Tabelle XII.

Nach	Zahl der in der Probelösung oben schwimmenden Eier. Vorbehandelt mit $^{n}/_{625}$-H_2SO_4				
	7	13	18	25	37 Min.
1 Std.	4	3	1	0	0
$2^1/_2$ Std.	0	0	0		

Schon nach 7 Minuten erhöht eine $^{n}/_{625}$-H_2SO_4-Lösung die Durchgängigkeit der Eihaut so erheblich, daß die Eier in der Probelösung schon in weniger als $2^1/_2$ Stunden zu Boden sinken.

In Gegenwart einer $^{m}/_{2}$-Na_2SO_4-Lösung wird in einer $^{n}/_{625}$-H_2SO_4-Lösung die Durchgängigkeit der Eihaut in $6^1/_2$ Minuten nicht merklich erhöht.

Tabelle XIII.

Nach	Zahl der in der Probelösung oben schwimmenden Eier. Vorbehandelt mit $^{n}/_{625}$-H_2SO_4 in $^{m}/_{2}$-Na_2SO_4							
	$6^1/_2$	11	22	33	42	56	80	150 Min.
$2^1/_2$ Std.	4	4	4	4	4	4	4	4
25 „	4	4	0	0	0	0	0	0
2 Tagen	2	1						
3 „	2	0						
4 „	0							

Wir wollen nun damit die Wirkung von HCl und die Hemmung dieser Wirkung durch NaCl vergleichen. Zunächst wurde die Wirkung einer reinen $^{n}/_{1250}$-HCl-Lösung untersucht.

Tabelle XIV.

Nach	Zahl der in der Probelösung oben schwimmenden Eier. Vorbehandelt mit $^{n}/_{1250}$-HCl						
	5	9	$12^1/_2$	$16^1/_2$	21	30	57 Min.
$2^1/_2$ Std.	4	4	2	1	0	0	0
$4^1/_2$ „	3	3	0	0			
23 „	1	0					

Die Wirkung der $^{n}/_{1250}$-HCl-Lösung ist nur wenig kräftiger als die der $^{n}/_{1250}$-H_2SO_4-Lösung.

Gleichzeitig wurde ein Versuch mit $^{n}/_{1250}$-HCl—$^{m}/_{2}$-(NaCl + KCl + $CaCl_2$) angestellt.

Tabelle XV.

Nach	Zahl der in der Probelösung oben schwimmenden Eier. Vorbehandelt mit $^n/_{1250}$-HCl in $^m/_2$-(NaCl + KCl + CaCl$_2$)							
	5	10	20	30	40	60	84	100 Min.
4 Stunden	4	4	4	2	0	2	3	1
6 „	4	4	4	1		2	1	0
23 „	4	1	0	0		0	0	

Wenn man Tabelle XV mit XI vergleicht, in der der entsprehende H_2SO_4—Na_2SO_4-Versuch mitgeteilt wird, so wird man bemerken, wie viel geringer die Hemmung der Wirkung von $^n/_{1250}$-HCl durch $^m/_2$-(NaCl + KCl + $CaCl_2$) als diejenige von $^n/_{1250}$-H_2SO_4 durch $^m/_2$-Na_2SO_4 ist. Im letzteren Falle war die Hemmung so stark, daß ein Aufenthalt von 20 Minuten in der Säurelösung die Durchgängigkeit der Eier kaum erhöhte, während im System $^n/_{1250}$-HCl—$^m/_2$-(NaCl + KCl + $CaCl_2$) bereits nach 20 Minuten die Durchgängigkeit der Eier erheblich erhöht wurde. Es besteht zwar ein Antagonismus zwischen HCl und NaCl, derselbe ist aber viel geringer als der Antagonismus zwischen H_2SO_4 und Na_2SO_4.

Es wurden schließlich noch Versuche mit der Wirkung von Essigsäure und Essigsäure in $^m/_2$-(NaCl + KCl + $CaCl_2$) angestellt. Tabellen XVI und XVII geben das Resultat.

Tabelle XVI.

Nach	Zahl der in der Probelösung oben schwimmenden Eier. Vorbehandelt mit 1,5 ccm $^n/_{10}$-Essigsäure + 50 ccm H_2O							
	4	8	12	17	22	29	37	46 Min.
7 Stunden	4	3	2	2	0	0	0	0
22 „	3	2	0	0				

Tabelle XVII.

Nach	Zahl der in der Probelösung oben schwimmenden Eier. Vorbehandelt mit 1,5 ccm $^n/_{10}$-Essigsäure + 50 ccm $^m/_2$-(NaCl + KCl + $CaCl_2$)						
	9	15	25	35	51	98	192 Min.
7 Stunden	4	4	4	4	4	4	4
22 „	3	4	4	4	1	4	3
2 Tagen	1	1	1	1	0	1	1

Die hemmende Wirkung der Salzlösung ist sehr schlagend.

Alle diese Versuche machen es wahrscheinlich, daß die Erhöhung der Durchlässigkeit der Eihaut unter dem Einflusse von Säuren und deren Hemmung durch die gleichzeitige Gegenwart von Salzen durch eine Wirkung von Säuren und Salzen auf Eiweißkörper zustande kommt. Denn wir kennen heute keine andere Gruppe von chemischen Körpern, die ein derartiges Verhalten zeigt.

Diese Versuche werfen auch ein Licht auf Versuche über den Antagonismus von Säuren und Salzen, die Wasteneys und ich vor kurzem mitgeteilt haben. Wir fanden, daß eine Säurelösung in niedriger Konzentration das Epithel von Fischen stark verändert, wodurch dasselbe in Fetzen abfällt, während der Zusatz von Salzen diese Wirkung verhindert. Wir nahmen an, daß die Säure allein die eiweißhaltige Oberflächenlamelle der Zellen zum Quellen bringt und infolgedessen die Durchgängigkeit der Oberflächenlamelle erhöht. Dadurch kann Säure in die Zellen dringen und dieselben töten. Ist aber außer der Säure auch Salz zugegen, so kann, infolge der kombinierten Wirkung von Säure und Salz, die Säure nicht mehr in die Zellen diffundieren, wodurch diese dann am Leben bleiben. Unsere neuen Versuche liefern nun den Beweis, daß in der Tat die Säure allein die Durchgängigkeit der Eihaut für Säure erhöht, während die Gegenwart von Salzen diese Erhöhung der Durchgängigkeit hemmt.

Damit stehen nun die folgenden Beobachtungen im Einklang. Bringt man die Eier von Fundulus in eine $^{n}/_{625}$-H_2SO_4-Lösung, so steht bei allen Embryonen in weniger als $1^1/_2$ Stunden das Herz still. Bringt man die Eier aber in $^{n}/_{625}$-H_2SO_4 in $^{m}/_{2}$-Na_2SO_4, so ist nach $1^1/_2$ Stunden bei allen Embryonen die Zirkulation im Gange, und selbst nach 15 Stunden findet man noch Embryonen mit intakter Zirkulation.

In $^{n}/_{1250}$-H_2SO_4 steht die Zirkulation in wenigen Stunden still. In einer $^{n}/_{1250}$-H_2SO_4-Lösung in $^{m}/_{2}$-Na_2SO_4 leben die Embryonen dauernd. Ebenso tötet $^{n}/_{333}$-Essigsäure alle die Embryonen ziemlich rasch, während in derselben Konzentration von Essigsäure in einer $^{m}/_{2}$-Lösung von $NaCl + KCl + CaCl_2$ die Embryonen dauernd am Leben bleiben. In der reinen Säurelösung erhöhte die Säure rasch die Durchgängigkeit der

Membran, Säure diffundierte in das Ei und erreichte den Embryo; das zeigte sich darin, daß nach 3 bis 5 Minuten in einer $^n/_{1250}$-HCl- oder H_2SO_4-Lösung die Embryonen plötzlich sehr unruhig wurden und lebhafte Bewegungen ausführten. Die Salzlösung hemmte diese Erhöhung der Permeabilität der Membran, und die Embryonen blieben ruhig und am Leben.

Der direkte Nachweis der Erhöhung der Durchgängigkeit der Membran durch Säuren, sowie der Nachweis der Hemmung dieser Erhöhung der Durchgängigkeit durch Salze und endlich der Nachweis, daß diese Hemmung im System H_2SO_4 — $^m/_2$-Na_2SO_4 vollständiger ist als im System HCl — $^m/_2$-(NaCl + KCl + $CaCl_2$), zwingt uns zur Annahme, daß die Erhöhung der Durchlässigkeit der Eihaut durch Säure durch eine Beeinflussung der Eiweißkörper der Membran durch die Säure bestimmt ist.

Man kann nun die Frage aufwerfen, ob Anzeichen dafür vorhanden sind, daß auch die Erhöhung der Durchgängigkeit der Membran durch Salze auf eine Modifikation von Eiweißkörpern in der Membran zurückgeführt werden kann. Vielleicht kann die folgende Erfahrung in diesem Sinne verwertet werden. Wenn man sich Lösungen von $MgCl_2$, $MgBr_2$ und $MgSO_4$ von $^8/_8$ m bis $^{20}/_8$ m herstellt und Eier von Fundulus in dieselben bringt, so beobachtet man, daß in den Lösungen von $MgCl_2$ und $MgBr_2$ die Eier in ganz kurzer Zeit eine starke Erhöhung ihrer Durchgängigkeit erleiden. Der Dottersack schrumpft, die Embryonen sterben, und die Eier sinken zu Boden. In den $MgSO_4$-Lösungen geht dieser Prozeß sehr viel langsamer vor sich. In einer $^{18}/_8$ m-$MgSO_4$-Lösung waren beispielsweise die Embryonen noch nach $8^1/_2$ Stunden am Leben, während sie in $^{10}/_8$ bis $^{20}/_8$ m-$MgBr_2$ schon in 40 Minuten alle tot waren. In $MgCl_2$ verlief der Versuch nicht wesentlich anders wie in $MgBr_2$. Es handelt sich hier um eine spezifische SO_4-Wirkung. Der Umstand, daß auch hier SO_4 die Durchgängigkeit nicht so rasch erhöht wie Cl und Br, steht vielleicht im Zusammenhange mit der Erfahrung, daß im System HCl — NaCl die Erhöhung der Durchgängigkeit durch Säure weniger stark gehemmt ist als im System H_2SO_4 — Na_2SO_4.

Ich beabsichtige, diese Versuche weiter auszudehnen, möchte

aber hier darauf hinweisen, daß vielleicht unsere Versuche den von Overton gefundenen Unterschied in der Wirkung von K_2SO_4 und KCl auf den Muskel begreiflich erscheinen lassen.

IX. Der Einfluß verschiedener Alkohole auf die Durchgängigkeit der Eihaut von Fundulus.

Für die physiologische Wirkung der Alkohole ist das Gesetz charakteristisch, daß jeder höhere Alkohol einer Reihe etwa dreimal so wirksam ist wie das voraufgehende Glied der Reihe. Dieses Gesetz weist auf eine Beziehung zwischen der Wirksamkeit der Alkohole und ihrer Lipoidlöslichkeit hin. Wir kennen keine derartige Beziehung zwischen Eiweißkörpern und Alkoholen. Es war deshalb von Interesse, zu ermitteln, ob erstens die Alkohole auch die Durchlässigkeit der Eihaut von Fundulus erhöhen, und ob zweitens die relative Wirksamkeit der verschiedenen Alkohole in dieser Hinsicht sich in eine Reihe nach Potenzen von 3 ordnen läßt. Das ist nun in der Tat der Fall, obwohl das Ende der Laichperiode nicht erlaubte, so viele Versuche anzustellen, als wir wünschten.

Die Alkohole wurden in Wasser gelöst, und die Eier wurden in einem verschlossenen Gefäß der Alkoholwirkung ausgesetzt. Nach verschiedenen Intervallen wurden je 4 Eier aus der Alkohollösung genommen, in Reagensgläser mit der Probelösung (50 ccm 3 m-NaCl + 1 ccm $2^1/_2$ m-$CaCl_2$) gebracht und ermittelt, wie lange sie an der Oberfläche schwimmen. Der folgende Versuch mit grammolekularem Äthylalkohol soll als Beispiel der Methode und des Versuchsverlaufes dienen.

Tabelle XVIII.

Nach	Zahl der oben schwimmenden Eier in der Probelösung. Vorbehandelt mit m-Äthylalkohol					
	2	$5^1/_2$	10	20	43	60 Min.
5 Stunden	4	4	4	3	2	1
$8^1/_2$ "	3	3	3	2	1	0
22 "	2	2	0	0	0	

Es wurden nun außerdem ähnliche Versuche mit folgenden Alkohollösungen angestellt: 2 m-Methylalkohol; 3 m-Äthylalkohol; $^m/_{16}$-, $^m/_8$-, $^m/_4$-Normal-Butylalkohol und $^m/_{16}$-Amylalkohol.

Das Resultat war wie folgt.

Die Durchlässigkeit der Eimembranen wurde ungefähr gleich schnell erhöht durch 2 m-Methylalkohol, m-Äthylalkohol, $^{m}/_{8}$-Butylalkohol. Ferner wirkte der $^{m}/_{4}$ normale Butylalkohol nahezu ebenso schnell wie $^{m}/_{16}$-Amylalkohol.

Diese Resultate deuten deutlich genug än, daß die Wirkung der verschiedenen Alkohole in diesem Falle mit ihrer Narkosewirkung parallel verläuft. Wenn es sich im letzteren Falle um Lipoidwirkungen handelt, so sollte das auch bei der Erhöhung der Durchlässigkeit der Eihaut der Fall sein. Nathanson und Höber haben bekanntlich den Gedanken ausgesprochen, daß die Membranen der Zellen aus einem Mosaik aus Eiweißkörpern und Lipoiden bestehen. Eine solche Hypothese würde allen Tatsachen gerecht werden.

Osterhout hat gefunden, daß kleine Mengen von Alkohol den galvanischen Widerstand von Laminaria vorübergehend etwas erhöhen, und R. Lillie spricht direkt von einem Antagonismus zwischen Elektrolyten und Narkotiken[1]). Bezieht man diese Wirkung auf eine Erhöhung der Durchgängigkeit der Membran, so wäre es von Interesse, zu prüfen, ob kleine Mengen von Alkohol auch die Erhöhung der Durchlässigkeit der Eihaut hemmen, welche durch Elektrolyte hervorgebracht wird. Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß Eier von Fundulus in Lösungen von 3 m-NaCl gebracht wurden, in denen sie nach wenigen Stunden zu Boden sinken. Zu einer Reihe derartiger Lösungen wurden wachsende Mengen von Äthyl-

Tabelle XIX.

Nach	Zahl der oben schwimmenden Eier in 50 ccm 3 m-NaCl +							
	0	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4
	ccm 90%igem(?) Alkohol[2])							
3 Stunden	4	3	3	4	3	4	4	0
$4^1/_2$ "	1	1	1	2	3	2	2	
6 "	0	0	0	2	2	1	0	
7 "				0	1	0		
8 "					0			

[1]) R. Lillie, Amer. Journ. of Physiol. 29, 372, 1912.

[2]) Der Alkohol hatte lange gestanden und die Flasche war öfters geöffnet worden. Es stellte sich später heraus, daß der Alkohol schwächer war als 90%, aber seine Konzentration war nicht ermittelt worden.

alkohol zugesetzt und beobachtet, ob und bis zu welchem Grade der Alkohol die Zeit des Sinkens der Eier hinausschiebt. Die vorstehende Tabelle (S. 155) gibt das Resultat.

Eine Wiederholung des Versuches ergab ein ähnliches Resultat, eine geringe Verzögerung des Sinkens der Eier in der Lösung mit 0,4 ccm Alkohol. Es ist möglich, daß hier eine geringe Hemmung der Erhöhung der Durchlässigkeit mittels kleiner Quantitäten Alkohol vorliegt. Die Wirkung ist aber bestenfalls sehr gering.

X. Die Wirkung von Zucker und Harnstoff auf die Permeabilität.

In 3 m-Harnstoff sinken die Eier von Fundulus sofort, in 4 m fast sofort. Erst in 5 m-Harnstoff schwimmen die Eier an der Oberfläche. Bringt man die Eier in 5 m-Harnstoff, so werden die Embryonen nach 5 Minuten unruhig und der Dotter beginnt zu schrumpfen; bald darauf sinken die Eier.

Der Verlauf des Versuches wird nicht geändert, wenn man zu 50 ccm 5 m-Harnstoff 1,6 ccm $2^1/_2$ m-$CaCl_2$ zusetzt.

Rohrzucker erhöht die Durchlässigkeit der Eihaut nur sehr langsam. Die Eier schwimmen in Lösungen von 0,6 m und darüber. Je 4 Eier wurden in folgende Lösungen von Rohrzucker gebracht: 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0 m. Selbst in den stärksten Konzentrationen, 2,0 und 1,8 m, waren nach 2 Tagen alle Eier am Leben und keine deutliche Schrumpfung des Dottersackes war eingetreten. Erst nach 4 Tagen wurde hier eine mäßige Schrumpfung bemerkbar. In der Zuckerlösung bleibt also die relative Undurchlässigkeit der Membran für Wasser lange erhalten. Eier, die $1^1/_2$ Tage lang in einer 2 m-Rohrzuckerlösung gewesen waren, wurden in die Probelösung gebracht (50 ccm 3 m-NaCl + 1 ccm $2^1/_2$ m-$CaCl_2$). Es war keine merkliche Erhöhung der Durchlässigkeit der Eihaut nachweisbar.

XI. Die Umkehrbarkeit der Durchgängigkeitsänderung der Eihaut von Fundulus.

Osterhout hat gefunden, daß in einer reinen NaCl-Lösung der galvanische Widerstand von Laminaria erheblich sinkt, daß die Pflanze aber in Seewasser ihren normalen Widerstand wieder

gewinnt. Er hat bei derselben Pflanze 8 Tage hintereinander die Erniedrigung des Widerstandes durch NaCl und die Wiederherstellung desselben in Seewasser nachgewiesen. Er schließt daraus mit Recht, daß die Änderung der Durchgängigkeit der Membran umkehrbar ist und daß vermutlich umkehrbare Änderungen der Durchgängigkeit eine große Rolle im Leben der Pflanzen spielen[1]).

Auch bei der Eihaut ist die Erhöhung der Durchlässigkeit der Membran durch Säure, Salze und Alkohole ein umkehrbarer Prozeß. Wir haben gesehen, daß Salze sowohl wie Säuren imstande sind, die Durchgängigkeit der Eihaut von Fundulus rasch zu erhöhen, und die nächste Frage war die nach der Umkehrbarkeit dieser Erscheinung. Das Verhalten der Nieren legt den Gedanken nahe, daß Änderungen der Durchgängigkeit eine Eigenschaft der Nierenzellen und vielleicht aller Zellen sind; wenn das wahr sein sollte, so müßten auch erhebliche Durchgängigkeitserhöhungen der Zellen umkehrbar sein. Die folgenden Versuche zeigen nun, in wie hohem Grade das der Fall ist. Diese Versuche haben aber noch eine andere Bedeutung, indem sie uns helfen, zu bestimmteren Anschauungen über den Mechanismus der beobachteten Durchgängigkeitsänderungen zu gelangen.

Eier wurden durch zweimaliges Waschen in destilliertem Wasser von Seewasser befreit und dann 40 Minuten in 0,4 ccm $^{n}/_{10}$-H_2SO_4 + 50 ccm H_2O gebracht. Dann wurden sie gewaschen und in Seewasser gebracht. In allen Eiern war die Zirkulation noch im Gange, die Durchlässigkeit ihrer Membran war aber stark erhöht (siehe Tabelle X). Von Zeit zu Zeit wurden nun je vier Eier aus dem Seewasser in die Probelösung (50 ccm 3 m-NaCl + 1 ccm $2^1/_2$ m-$CaCl_2$) übertragen, um zu ermitteln, ob ihre Permeabilität wieder normal geworden sei. Die ersten Eier wurden sofort nach dem Waschen aus dem Seewasser in die Probelösung übertragen; sie sanken in weniger als 2 Stunden; die nächste Partie wurde nach einem Aufenthalt von 40 Minuten im Seewasser in die Probelösung gebracht; diese Eier sanken ebenfalls nach weniger als 2 Stunden. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die gesamten Resultate.

[1]) Science 36, 350, 1912.

Tabelle XX.

Dauer des Aufenthaltes der Eier in Seewasser nach der Säurebehandlung	Zeit, die die Eier an der Oberfläche der Probelösung schwimmen
0 Minuten	$<$ 2 Stunden
40 „	$<$ 2 „
165 „	$>$ 4 „
$4^1/_2$ Stunden	$>$ 19 „ 3 Eier mehr als 3 Tage!

Die Eier, die noch später als nach $4^1/_2$ Stunden aus dem Seewasser genommen wurden, waren nahezu normal. Wir dürfen also sagen, daß in den ersten 40 Minuten im Seewasser die durch Säure bedingte Erhöhung der Durchlässigkeit der Eihaut nicht rückgängig wird, daß aber nach rund 3 Stunden schon eine mäßige Erholung eingetreten ist, und daß nach $4^1/_2$ Stunden die Erholung nahezu vollständig ist. Um bloße Adsorptionserscheinungen kann es sich hier wohl nicht handeln, da sonst der Einfluß der ersten 40 Minuten viel stärker sein müßte. Ich beabsichtige aber den Verlauf der Erholung im nächsten Sommer etwas genauer zu untersuchen.

Zur Ergänzung diene folgender Versuch mit HCl. Eier blieben 57 Minuten in 0,4 $^n/_{10}$-HCl + 50 ccm H_2O, und wurden dann in Seewasser übertragen (siehe Tabelle XIV). Um diese Zeit besaßen etwa 75% der Embryonen noch Herzschlag, bei allen stellte sich aber die Zirkulation wieder ein, nachdem sie einige Zeit im Seewasser gewesen waren. Nach 0, $1^1/_2$, $4^1/_2$ und 7 Stunden wurden je vier Eier aus dem Seewasser in die Probelösung gebracht. In $1^1/_2$ Stunden fand keine nennenswerte Erholung statt, und selbst nach $4^1/_2$ Stunden war nur bei einem unter den vier untersuchten Eiern eine mäßige Erholung eingetreten. Eine deutliche Erholung war erst bei den Eiern bemerkbar, die 7 Stunden lang nach der Säurebehandlung im Seewasser gewesen waren. Nach einem Aufenthalt von 24 Stunden im Seewasser waren die Eier praktisch wieder normal geworden, d. h. sie schwammen mehrere Tage lang an der Oberfläche der Probelösung (50 ccm 3 m-NaCl + 1 ccm $2^1/_2$ m-$CaCl_2$).

Es wurde dann versucht, ob die schädigende Wirkung einer $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$-Lösung ebenfalls umkehrbar ist. Eine große Zahl von Eiern wurde in eine $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$-Lösung gebracht

und eine Portion derselben nach 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 15 und 16 Minuten in Seewasser übertragen. Alle blieben 24 Stunden lang in dem Seewasser und wurden dann in die hypertonische Probelösung übertragen. Es zeigte sich, daß ein Teil der Eier (nicht alle), die 13 Minuten oder weniger der $^{10}/_8$ m-CaCl-Lösung ausgesetzt gewesen waren, sich nahezu völlig erholt hatten. Man muß berücksichtigen, daß eine $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$-Lösung die Durchgängigkeit der Eihaut rascher schädigt als eine $^n/_{1250}$-Lösung von HCl oder H_2SO_4.

Auch die schädigende Wirkung des Alkohols ist umkehrbar. Eier waren 91 Minuten in eine Lösung von Äthylalkohol gebracht worden, deren Konzentration durch ein Versehen nicht genau bestimmt wurde, die aber vermutlich ein wenig stärker als grammolekular war. Die Eier wurden dann in Seewasser übertragen, und nach 0, 7, 30, 130 und 292 Minuten wurden je vier Eier in die Probelösung übertragen. Die Eier, die 0, 7 und 30 Minuten im Seewasser gewesen waren, sanken in der Probelösung ungefähr gleich schnell. Drei der Eier aber, die 130 Minuten in dem Seewasser gewesen waren, zeigten vollständige Erholung und schwammen mehrere Tage lang an der Oberfläche der Probelösung.

Diese Versuche mögen genügen, um zu zeigen, daß die Erhöhung der Durchgängigkeit der Eimembranen ein umkehrbarer Vorgang ist.

XII. Über die Rolle der Salze bei der Umkehr der Permeabilitätsänderung.

In den eben beschriebenen Versuchen waren die Eier zur Erholung in Seewasser gebracht worden. Wasteneys und ich hatten gefunden, daß Fundulus größere plötzliche Temperaturerhöhungen ertragen können, wenn der Fisch im Seewasser, als wenn er sich in destilliertem Wasser befindet[1]). Da die Möglichkeit vorlag, daß hierbei Änderungen der Permeabilität des Epithels eine Rolle spielen, so stellte ich Versuche darüber an, ob sich die Funduluseier in destilliertem Wasser und in verschiedenen Salzlösungen ebenso rasch erholen als im Seewasser.

[1]) Journ. of Exper. Zoology 12, 543, 1912.

Diese Versuche ergaben nun das merkwürdige Resultat, daß in destilliertem Wasser die Eier mit geschädigter Membran zwar dauernd am Leben bleiben, sich weiter entwickeln und ausschlüpfen, daß aber die Änderung der Durchlässigkeit im destillierten Wasser praktisch nicht umkehrbar ist.

In all den Versuchen über Reversibilität, die im vorigen Abschnitt erwähnt wurden, wurden immer Parallelversuche derart angestellt, daß die eine Hälfte der Eier nach der Behandlung mit Säure oder Alkohol in Seewasser, die andere Hälfte in destilliertes Wasser gebracht wurde, um zu prüfen, ob sich hier die normale Undurchlässigkeit der Eihaut in beiden Fällen gleich schnell wieder herstellen würde.

Eier wurden 57 Minuten lang einer $^{n}/_{1250}$-HCl-Lösung ausgesetzt und dann wurde ein Teil in Seewasser, der Rest in destilliertes Wasser gebracht, um zu ermitteln, ob in beiden Lösungen die Erholung gleich schnell vonstatten ginge. Nach 22 Stunden wurden je 4 Eier in die Probelösung gebracht. Die Eier, die 22 Stunden im Seewasser gewesen waren, hatten sich völlig erholt, sie schwammen zum Teil 4 Tage lang in der Probelösung. Die Eier aber, die 22 Stunden im destillierten Wasser gewesen waren, sanken schon in weniger als 7 Stunden in der Probelösung. Im destillierten Wasser war also die durch Säure verursachte Erhöhung der Durchlässigkeit der Membran nur zu einem geringen Teil rückgängig geworden. Wenn die Eier 2 bis 3 Tage zur Erholung in destilliertem Wasser blieben, so sanken sie noch rascher in der Probelösung. Man gewinnt also den Eindruck, daß in destilliertem Wasser anfangs eine geringe Erholung stattfindet, die aber bei längerem Aufenthalt wieder schwindet.

Ein Teil der Eier, die 40 Minuten lang mit $^{n}/_{1250}$-H_2SO_4 vorbehandelt waren, wurde in Seewasser, der Rest in destilliertes Wasser gebracht. Nach 21 Stunden wurden 4 Eier aus dem destillierten Wasser in die Probelösung übertragen. Nach weniger als 5 Stunden waren alle diese Eier am Boden. Die zur Erholung in Seewasser gebrachten Eier schwammen zum Teil noch nach 4 Tagen an der Oberfläche der Probelösung. Auch wenn die Eier zur Erholung mehrere Tage in dem destillierten Wasser blieben, so trat keine Umkehr der

in der Säurelösung erfolgten Erhöhung der Durchlässigkeit ein. Die Eier aber waren sonst völlig normal und entwickelten sich in destilliertem Wasser weiter.

Genau so verhielten sich die Eier, deren Durchlässigkeit durch andere Stoffe, nämlich $HgCl_2$ oder Alkohol, erhöht war. Wurden die Eier aus diesen Lösungen genommen, ehe die Embryonen tot waren, als aber die Durchlässigkeit der Membran beteits stark erhöht war, so trat nach einigen Stunden eine Erholung der Eihaut ein, wenn die Eier in Seewasser gebracht wurden; wurden aber die Eier in destilliertes Wasser gebracht, so trat anfangs eine sehr geringe Erholung ein, die aber alsbald wieder völlig zurückging.

Es entstand nun die Frage, ob die Alkalinität des Seewassers oder der Salzgehalt für diese Erholung verantwortlich sei. Versuche ergaben, daß die Eier sich in einer neutralen $^m/_2$-Lösung von $NaCl + KCl + CaCl_2$ ungefähr ebenso rasch und vollständig erholen wie in Seewasser.

Wir gewinnen den Eindruck, daß im Leben der Zelle Änderungen der Durchlässigkeit häufig eintreten, daß dieselben aber umkehrbar sind und daß diese Umkehrbarkeit von der Gegenwart von Salzen herrührt.

XIII. Die Erhöhung der Durchlässigkeit der Eimembran durch destilliertes Wasser.

Die im vorigen Abschnitt erwähnten Versuche deuteten bereits darauf hin, daß das destillierte Wasser selbst die Durchgängigkeit der Eihaut erhöht. Das würde deshalb auffällig sein, weil die Eier von Fundulus sich in destilliertem Wasser völlig normal entwickeln und ausschlüpfen können[1]). Es wurde nun folgender einfache Versuch ausgeführt: Eine Kultur von Eiern wurde 2 Tage nach der Befruchtung in 2 Teile geteilt. Ein Teil der Eier blieb im Seewasser, der Rest wurde in destilliertes Wasser übertragen. Nach verschiedenen Intervallen wurden je 4 Eier in die Probelösung übertragen und fest-

[1]) Man muß bei Versuchen in destilliertem Wasser die Vorsicht gebrauchen, die abgestorbenen Eier sofort zu entfernen, da sich sonst rasch hier Pilze bilden, die die noch lebenden Eier infizieren. Das Übersehen dieses Umstandes hat wohl einige Autoren zu dem irrigen Schluß geführt, daß die Funduluseier nicht in destilliertem Wasser ausschlüpfen.

gestellt, wie lange die Eier oben schwimmen. Tabelle XXI gibt das Resultat für destilliertes Wasser.

Tabelle XXI.

Dauer des Aufenthaltes der Eier in dest. Wasser	Zeit, die die Eier an der Oberfläche der Probelösung schwimmen
1 Tag	>34 <48 Stunden
2 Tage	>10 <24 Stunden
3 Tage	>10 <24 Stunden
4 Tage	2 sinken in weniger als 10 Stunden, der Rest „ „ „ 24 „
5 Tage	3 sinken in weniger als 8 Stunden, das vierte „ „ „ 24 „
7 Tage	6 Stunden
8 Tage	4 Stunden

Die Eier, die im Seewasser geblieben waren, schwammen in der Probelösung wie gewöhnlich 3 Tage oder länger. Nur gegen die Zeit des Ausschlüpfens wird auch hier die Durchgängigkeit der Membran erhöht. Es ist also sicher, daß die Durchlässigkeit der Eihaut durch das destillierte Wasser langsam, aber stetig zunimmt[1]). Daß Mikroorganismen hierfür verantwortlich sein könnten, ist möglich, aber nicht sehr wahrscheinlich, weil die Resultate so regelmäßig waren. Es ist auch möglich, daß es sich hier nicht oder nicht bloß um eine Wirkung des destillierten Wassers selbst, sondern um eine Wirkung der CO_2 handelt; im Seewasser wird die Säure neutralisiert, und selbst in einer neutralen Salzlösung hemmt die Gegenwart des Salzes die Säurewirkung auf die Membran.

XIV. Das Verhalten toter Eier.

Es ist lange bekannt, daß die Durchlässigkeit der Zellen mit dem Tode erhöht wird. So lange es sich um die Durchlässigkeit des Protoplasmas handelt, ist das leicht zu verstehen.

[1]) In einem Versuche, in dem eine $^{20}/_8$ m-Lösung von ($NaCl + KCl + CaCl_2$) als Probelösung benutzt wurde, war die Erhöhung der Permeabilität der Eihaut nicht so beträchtlich wie in dem vorher zitierten Versuche.

Es interessierte mich, wie es sich mit der Eihaut des Fischembryos verhält, die ja nur eine lose Hülle um den Embryo und Dotter bildet und mit dem letzteren in keinem direkten Zusammenhang steht. Es wurden Versuche mit einer 4%igen Formaldehydlösung gemacht, die als Konservierungsflüssigkeit für Tiere dient. Nach 25 Minuten standen die Herzen der Embryonen still, zum Zeichen, daß ein wenig der Lösung schon in das Ei eingedrungen war. Eier, die 30 Minuten in dieser Lösung gewesen waren, sanken in der Probelösung schon nach 70 Minuten zu Boden. Ein Teil der Eier blieb 24 Stunden in der Lösung und es wurde untersucht, ob nun die Eihaut undurchgängiger geworden sei. Das war aber nicht der Fall; die Eier sanken in der Probelösung in weniger als 50 Minuten zu Boden. In einem anderen Falle wurden Eier 4 Stunden lang in eine $^{n}/_{1250}$-HCl-Lösung gebracht. Die Eier waren undurchsichtig und geschwollen, die Säure war also in das Innere gedrungen. Wenn diese Eier in die Probelösung gebracht wurden, so sanken sie in 5 Minuten oder noch schneller. Dabei fand eine kolossale Schrumpfung statt. Die Membran war jetzt für Wasser leicht durchgängig, für Salze aber wohl etwas weniger leicht, daher die Schrumpfung.

In allen diesen Fällen aber ging die Änderung der Durchlässigkeit der Membran dem Tode der Tiere vorauf, und so werfen diese Versuche kein Licht auf die Frage, ob das Absterben des Embryos die Durchgängigkeit der Eihaut erhöht, etwa in der Weise, daß der lebende Embryo fortwährend Stoffe produziert, welche zur Erhaltung der Eihaut beitragen, oder daß der Tod des Embryos zur Bildung oder Nichtzerstörung von Stoffen führt, die die Durchgängigkeit der Eihaut erhöhen.

Um diese Frage zu prüfen, wurden eine Reihe von Eiern, die 10 Tage vorher befruchtet waren, in folgende zwei Lösungen, in $^{5}/_{8}$ m-KCl und in $^{5}/_{8}$ m-NaCl, verteilt. Während die frisch befruchteten Eier rasch in einer reinen $^{5}/_{8}$ m-NaCl-Lösung sterben (weil die Membran unmittelbar nach der Befruchtung sehr durchgängig ist), ist dieselbe Lösung einige Tage nach der Befruchtung fast unschädlich, weil inzwischen die Mikropyle oder die Membran im Seewasser hinreichend undurchgängig und widerstandsfähig geworden ist. Die Eier, die in die $^{5}/_{8}$ m-NaCl-Lösung gebracht wurden, waren in dieser Lösung noch nach

10 Tagen am Leben, d. h. Herzschlag und Zirkulation war bei ihnen erhalten. Bei den Eiern dagegen, die in die $^5/_8$ m-KCl-Lösung übertragen wurden, stand die Zirkulation bei allen schon in weniger als 5 Stunden still. Etwas KCl war also durch diese Membran gedrungen und hatte das Herz zum Stillstand gebracht. Nun sterben die Embryonen, wie ich vor 20 Jahren zeigte, nicht sofort, wenn der Herzschlag erlischt, was man dadureh zeigen kann, daß dieselben sich wieder erholen, wenn sie in normales Seewasser gebracht werden. Aber diese Periode latenten Lebens ist doch beschränkt. Nach verschiedenen Intervallen wurden je 4 Eier aus beiden Lösungen genommen und in die Probelösung (50 ccm 3 m-NaCl + 1 ccm $2\,^1/_2$ m-$CaCl_2$) übertragen.

Es zeigte sich nun, daß die Eier, die bis zu 4 Tagen in der $^5/_8$ m-NaCl-Lösung gewesen waren, keine Erhöhung der Durchgängigkeit zeigten, wenn sie in die Probelösung gebracht wurden. Sie schwammen 3 Tage oder länger an der Oberfläche. Nach 4 Tagen aber befanden sich die Eier, die in der KCl-Lösung geblieben waren, im Zustand der Fäulnis und die Eier sanken in der Probelösung in 5 bis 10 Minuten. Freilich könnte man das auf eine Erhöhung der Durchgängigkeit der Membran durch Bakterien beziehen. Aber bereits nach einem Aufenthalt von 3 Tagen in der $^5/_8$ m-KCl-Lösung zeigten die Eier eine Erhöhung der Durchgängigkeit, indem sie in weniger als 24 Stunden in der Probelösung zu Boden sanken.

Diese Versuche stützen doch vielleicht den Gedanken, daß die Änderung gewisser chemischer Prozesse im Ei, die mit dem Eintritt des Todes stattfindet, auch eine Erhöhung der Durchlässigkeit der Membran herbeiführt.

XV. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Aufgabe der Arbeit war die weitere Prüfung der Theorie antagonistischer Salzlösungen, wonach die antagonistischen Salze die Erhöhung der Durchgängigheit der Membran hindern, die jedes oder eines der Salze bedingt, wenn es in derselben Konzentration allein in Lösung ist. Diese Prüfung wurde am Ei von Fundulus durchgeführt, an dem die Daten für die Aufstellung dieser Theorie seinerzeit gewonnen waren. Als physiologisch äquilibrierte Salzlösungen werden solche Lösungen bezeichnet, in denen diese antagonistische Wirkung ein Maximum ist.

2. Es wird eine Methode zur Untersuchung der Erhöhung der Durchgängigkeit der Eihaut angegeben, die darauf beruht, daß die Eihaut für Wasser und Salze normalerweise undurchgängig ist. Bringt man befruchtete Eier von Fundulus in eine Lösung von 50 ccm 3 m-NaCl + 2 ccm $^{10}/_{8}$ m-$CaCl_2$, so schwimmen die Eier etwa 3 Tage an der Oberfläche dieser Lösung. Erst allmählich erhöht diese stark hypertonische Lösung die Durchgängigkeit der Membran und infolgedessen beginnen die Eier nach etwa 3 Tagen zu schrumpfen und infolge der Erhöhung ihres spezifischen Gewichtes zu Boden zu sinken.

3. Bringt man die Eier in eine Lösung nur eines der folgenden Salze, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $SrCl_2$ und $BaCl_2$ in Konzentrationen von m bis $2^1/_2$ m, so schrumpfen und sinken die Eier von Fundulus in etwa $^1/_2$ Stunde, und zwar um so rascher, je höher innerhalb der angegebenen Grenzen die Konzentration der Lösung ist. Bringt man die Eier in 3 m-Lösungen von NaCl (oder KCl oder LiCl), so sinken dieselben in etwa 3 bis 4 Stunden. Alle diese Lösungen sind nicht äquilibrierte Lösungen. Bringt man die Eier aber in eine Mischung von 50 ccm 3 m-NaCl + 2 ccm $2^1/_2$ m-$CaCl_2$, so schwimmen die Eier, wie erwähnt, 3 Tage oder länger in der Lösung.

4. Es läßt sich allgemein zeigen, daß in physiologisch äquilibrierten Salzlösungen die Durchlässigkeit der Eimembran nur sehr langsam, in nicht äquilibrierten Lösungen dagegen sehr rasch erhöht wird. In meinen früheren Versuchen habe ich gezeigt, daß in einer reinen NaCl-Lösung der Embryo von Fundulus rasch getötet wird, daß aber der Zusatz von einer kleinen Menge eines Erdalkalisalzes diese giftige Wirkung des NaCl (oder irgendeines anderen Salzes der Alkalimetalle) aufhebt. Die neuen Versuche zeigen, daß der Zusatz einer bestimmten, aber kleinen Menge eines Salzes der Erdalkalien zu einer 3 m-NaCl-Lösung die Erhöhung der Durchgängigkeit erheblich verzögert. In einer $2^1/_2$ m-Lösung von NaCl + KCl + $CaCl_2$ schwammen manche Eier 11 Tage lang an der Oberfläche der Lösung, während in einer $2^1/_2$ m-NaCl-Lösung die Eier schon nach etwa 6 Stunden oder noch früher zu Boden sanken.

5. Es wird ein Versuch gemacht zu entscheiden, ob die Eiweißkörper der Eihaut für die Durchgängigkeit der Membran für Wasser und Salze in Betracht kommen. Für Eiweißkörper

ist der Antagonismus zwischen Säuren und Salzen charakteristisch und außerdem die Erfahrung, daß dieser Antagonismus im System H_2SO_4—Na_2SO_4 viel vollständiger ist als im System HCl—NaCl. Es wird nun in dieser Arbeit gezeigt, daß eine kurze Behandlung der Eier mit Säure die Durchgängigkeit der Eihaut für Wasser (und vielleicht auch für Salze) rasch erhöht; daß Salze diese Erhöhung der Durchgängigkeit der Eihaut hemmen, resp. verzögern, und daß diese Hemmung im System H_2SO_4—Na_2SO_4 viel vollständiger ist als im System HCl—NaCl. Daraus wird gefolgert, daß die Erhöhung der Durchgängigkeit der Eihaut für Wasser und Salze durch eine Modifikation der Eiweißkörper der Membran bedingt wird.

6. Wenn dieser Schluß richtig ist, so ist Grund für die Vermutung vorhanden, daß der Austausch von Wasser und wasserlöslichen Bestandteilen zwischen Zellen und umgebender Flüssigkeit eine Funktion der Eiweißbestandteile der Membran ist.

7. Alkohole erhöhen ebenfalls die Durchgängigkeit der Eihaut von Fundulus, und zwar ist die Geschwindigkeit, mit der die verschiedenen Alkohole die Durchlässigkeit erhöhen, für jeden folgenden Alkohol angenähert dreimal so groß wie für den voraufgehenden derselben Reihe. Das weist darauf hin, daß für die Wirkung der Alkohole auf die Durchgängigkeit fettartige Bestandteile der Membran in Betracht kommen.

8. Die Erhöhung der Durchlässigkeit der Membran ist umkehrbar, so lange dieselbe nicht zu weit fortgeschritten ist. Aber eine völlige Erholung des Eies tritt nur in Salzlösungen, z. B. Seewasser resp. $^m/_2$-($NaCl + KCl + CaCl_2$) ein. Bringt man die Eier beispielsweise nach einer kurzen Säurebehandlung, die die Durchgängkeit der Eier erheblich erhöht, aber die Embryonen nicht tötet, in Seewasser, so erholen sich die Eier in wenigen Stunden, d. h. sie sind imstande, an der Oberfläche einer Mischung von 50 ccm 3 m-NaCl + 2 ccm $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$ 3 Tage lang zu schwimmen. Bringt man die Eier aber in destilliertes Wasser, so bleiben sie hier am Leben und die Fische können auch ausschlüpfen, aber sie gewinnen ihre Undurchgängigkeit nicht wieder. Wenn man solche Eier aber in 50 ccm 3 m-NaCl + 2 ccm $^{10}/_8$ m-$CaCl_2$ bringt, so sinken sie in wenigen Stunden.

Über die diastatische Kraft des menschlichen Mundspeichels.

Von

Goichi Hirata, Mihara, Bingo (Japan).

(Eingegangen am 5. November 1912.)

Obwohl über Ptyalin, d. h. das diastatische Ferment des Mundspeichels, von vielen Autoren eingehende Forschungen gemacht worden sind, so stimmen deren Resultate doch in mancher Hinsicht nicht überein. Zudem kann man auch wohl vermuten, daß in dem Speichel von uns Japanern, die pflanzenreichere Kost als die Europäer bekommen, auf die diastatischen Fermente höchstwahrscheinlich ein höherer Wert zu legen sei.

Daß die diastatischen Fermente des Speichels bei den Herbivoren stets weit stärker wirken als bei den Carnivoren, ist ja eine schon bekannte Tatsache.

Demnach sollten meine Untersuchungen folgende Fragen lösen:

1. Behält die diastatische Kraft des menschlichen Mundspeichels durch den ganzen Tag stets denselben Wert?

2. Übt die Art der Nahrung auf die diastatische Kraft einen Einfluß aus?

3. Wie gestaltet sich das Verhältnis zwischen dem Quantum des produzierten Speichels und der diastatischen Energie?

4. Haben Lebensalter und Geschlecht Einfluß auf die diastatische Energie?

5. Ist die diastatische Kraft bei Gesunden und Kranken verschieden?

Da über diese Fragen die Meinungen der Autoren heute noch weit auseinandergehen, nahm ich folgende Versuche vor, wozu ich mich des gemischten Mundspeichels bedienen mußte, weil das Ptyalin ganz rein darzustellen heute noch nicht gelingt.

Vor der Gewinnung des Speichels ließ ich jede Person stets mit Aqua dest. erst gründlichst den Mund spülen und in ein Becherglas das nötige Speichelquantum (10 bis 20 ccm), das durch mit der Zunge ausgeführte saugende Bewegungen frisch produziert wird, auffangen. Das Speichelquantum wurde dann 30 bis 40 Minuten lang ganz ruhig im Becherglase stehen gelassen und der obere klare Saft für den Zweck meiner Versuche mit der Pipette abgenommen. Der Speichel wurde in wenigen Fällen bald durch Glaswolle filtriert, bald mittels Zentrifuge von etwaigen Beimengungen befreit, ohne daß diese Vorbehandlung irgendeinen Einfluß auf das Resultat gehabt hätte.

Deshalb machte ich die Versuche in den meisten Fällen mit dem oberen klaren Saft, der durch 30 bis 40 Minuten langes Stehen im Becherglase sich spontan geklärt hatte.

Unter den vielen Methoden zur Bestimmung der diastatischen Kraft, die uns schon bekannt sind, bediente ich mich der von Wohlgemuth[1]) angegebenen Methode, die sich auch für meine Speicheluntersuchung vorzüglich eignete.

1. Behält die diastatische Kraft des menschlichen Speichels durch den ganzen Tag immer denselben Wert?

Zur Lösung dieser Frage haben meines Wissens schon Hofbauer[2]), Schüle[3]), Müller[4]), Fricker[5]) und Wohlgemuth[6]) Versuche angestellt. Die Resultate der drei erstgenannten Autoren stimmen darin gut überein, daß die diastatische Kraft des menschlichen Speichels vom Morgen bis zum Mittag ansteigt, um gegen Abend wieder zu sinken, daß somit sukzessive die diastatische Kraft des menschlichen Speichels nach den Tageszeiten schwankt.

Fricker konnte aber die Resultate von Hofbauer, Schüle und Müller nur bei dem im nüchternen Zustande des Morgens produzierten Mundspeichel bestätigen und kam

---

1) Wohlgemuth, diese Zeitschr. 9, 1, 1908.
2) Hofbauer, Arch. f. d. ges. Physiol. 65, 503, 1897.
3) Schüle, Arch. f. Verdauungskrankh. 5, 165, 1899.
4) Müller, Dissert., Freiburg 1899.
5) Fricker, Arch. f. Verdauungskrankh. 16, Heft 4, S. 2 bis 3, 1910.
6) J. Wohlgemuth, diese Zeitschr. 9, 10, 1909.

mit dem unmittelbar nach der Nahrungsaufnahme gewonnenen Speichel zu einem anderen Resultat: die diastatische Kraft, die im nüchternen Zustande des Morgens herabgesetzt ist, erreicht nämlich sofort nach dem Frühstück dieselbe Stärke wie vor und unmittelbar nach der Mittagsmahlzeit.

Diese Resultate der genannten Autoren konnte Wohlgemuth nicht bestätigen, vielmehr fand er eine große Regellosigkeit hinsichtlich der diastatischen Kraft des Speichels.

Um die Frage zu entscheiden, habe ich also den Mundspeichel, der von einem gesunden Mann und zwei gesunden Frauen genommen wurde, geprüft.

Das Resultat ist wie folgt:

Tabelle I.

A. Die diastatische Kraft des im nüchternen Zustande am Morgen produzierten Mundspeichels.

Datum 1910	Nr. 1 Männlich	Nr. 2 Weiblich	Nr. 3 Weiblich	Anmerkung
6h vorm. 10. VIII.	$D^{38°}_{30'}$ 160	$D^{38°}_{30'}$ 640	$D^{38°}_{30'}$ 160	Nr. 1 35 Jahre alt „ 2 17 „ „ „ 3 19 „ „
6h vorm. 11. VIII.	„ 320	„ 160	„ 160	
7h vorm. 12. VIII.	„ 160	„ 160	„ 160	
5h vorm. 14. VIII.	„ 160	„ 160	„ 160	
6h 30′ vorm. 15. VIII.	„ 640	„ 160	„ 640	
7h vorm. 16. VIII.	„ 160	„ 640	„ 320	
6h vorm. 17. VIII.	„ 160	„ 640	„ 160	

Wie aus diesem Resultat ersichtlich, ist die diastatische Kraft 14 mal $D^{38°}_{30'}$ 160, d. h. 1 ccm Speichel war bei 38° in 30 Minuten imstande, 160 ccm einer $1\,^0/_0$igen Stärkelösung zu verdauen, und 2 mal $D^{38°}_{30'}$ 320, 5 mal $D^{38°}_{30'}$ 640.

Wir wissen also, daß der im nüchternen Zustande abgesonderte Mundspeichel des gesunden Menschen in der größten Zahl der Fälle in 30 Minuten 160 ccm einer $1\,^0/_0$igen Stärkelösung zu Dextrin abbauen kann, aber manchmal 320 ccm oder auch 640 ccm.

Hieraus kann man folgenden Schluß ziehen:

Die diastatische Kraft des im nüchternen Zustande morgens von gesunden Menschen abgesonderten Speichels schwankt zwischen $D_{30'}^{38°}$ 160 und $D_{30'}^{38°}$ 640.

Um die Frage, welche Unterschiede in der diastatischen Kraft zwischen dem morgens nüchtern sezernierten Speichel und dem unmittelbar nach dem Frühstück sezernierten vorhanden sind, zu entscheiden, untersuchte ich den Speichel der genannten drei Menschen weiter und gelangte zu folgendem Resultat:

Tabelle I.

B. Die diastatische Kraft des unmittelbar nach dem Frühstück sezernierten Speichels.

Datum 1910	Nr. 1 Männlich	Nr. 2 Weiblich	Nr. 3 Weiblich	Anmerkung
7^h 20′ vorm. 16. VIII.	$D_{30'}^{38°}$ 640	$D_{30'}^{38°}$ 160	$D_{30'}^{38°}$ 160	Alle sind dieselben Individuen wie in Tab. I A.
7^h 15′ vorm. 17. VIII.	„ 320	„ 320	„ 160	
7^h 25′ vorm. 18. VIII.	„ 160	„ 640	„ 640	
7^h 30′ vorm. 20. VIII.	„ 160	„ 160	„ 640	
7^h 30′ vorm. 21. VIII.	„ 160	„ 160	„ 640	

Aus obiger Tabelle geht hervor, daß die diastatische Kraft des morgens nüchtern abgesonderten Speichels gegen den unmittelbar nach dem Frühstück sezernierten stets denselben Wert hat. Bei dieser Untersuchung fand ich nämlich 9mal $D_{30'}^{38°}$ 160, 2mal $D_{30'}^{38°}$ 320 und 4mal $D_{30'}^{38°}$ 640.

Ich konnte also hier die Frickersche Äußerung: „Die diastatische Kraft, die im morgens nüchtern gewonnenen Speichel herabgesetzt ist, erreicht sofort nach dem Frühstück denjenigen Grad von Wirksamkeit, wie ihn der Speichel vor und unmittelbar nach der Mittagsmahlzeit besitzt“, nicht bestätigen.

Aus diesem Befunde können wir folgendes resümieren:

Die diastatische Energie des von Gesunden abgesonderten Mundspeichels schwankt, ganz gleichgültig ob vor oder unmittelbar nach dem Essen, stets zwischen $D_{30'}^{38°}$ 160 und $D_{30'}^{38°}$ 640.

Dann setzte ich meine Versuche fort, um die Frage zu entscheiden, ob die diastatische Kraft wirklich vom Morgen bis zum Mittag allmählich ansteigt. Ich bediente mich dazu des Mundspeichels der genannten drei Individuen, und 5 Tage lang ließ ich sie regelmäßig um 7 Uhr frühstücken, wie gewöhnlich. Nach dem Frühstück wurde ihnen der Speichel vormittags 4mal (um 8, 9, 10 und 11 Uhr) abgenommen, und der Speichel jedes von den Dreien wurde im ganzen 20mal untersucht. So konstatierte ich als Resultat der 60maligen Untersuchung 49mal $D_{30'}^{38°}$ 160, 5mal $D_{30'}^{38°}$ 320 und 6mal $D_{30'}^{38°}$ 640.

Also stimmt mein Resultat mit dem von Wohlgemuth überein, weicht aber von dem von Hofbauer, Schüle, Müller und Fricker ab, und ich möchte daraus folgenden Satz aufstellen:

Abgesehen davon, daß die diastatische Kraft des von Gesunden produzierten Mundspeichels stets physiologische Schwankungen im Verlaufe des Tages aufweist, kann man keine zeitlichen Einflüsse im Vormittag konstatieren, wodurch die diastatische Kraft vom Morgen bis zum Mittag sukzessive an Stärke zunimmt. (Es fehlen Tagesschwankungen.)

Weiter habe ich die Frage, ob tatsächlich der Speichel den stärksten Grad von Wirksamkeit unmittelbar vor und nach der Mittagsmahlzeit besitzt, dann aber im weiteren Verlauf der Tageszeit wieder regelmäßig an Wirksamkeit abnimmt, geprüft.

Dazu untersuchte ich 5 Tage lang wieder den Mundspeichel der genannten drei Menschen.

Tabelle I.

C. Die diastatische Kraft des vor der Mittagsmahlzeit produzierten Mundspeichels.

Datum 1910	Nr. 1 Männlich	Nr. 2 Weiblich	Nr. 3 Weiblich	Anmerkung
11h 50′ vorm.				
17. IX.	$D_{30'}^{38°}$ 160	$D_{30'}^{38°}$ 320	$D_{30'}^{38°}$ 320	Lebensjahre der drei Individuen sind dieselben wie in Tabelle I, A. und B. Mittagsessen stets punkt 12 Uhr
18. „	„ 160	„ 320	„ 160	
19. „	„ 640	„ 160	„ 160	
22. „	„ 160	„ 160	„ 640	
24. „	„ 160	„ 160	„ 160	

Tabelle II.

D. Die diastatische Kraft des nach der Mittagsmahlzeit produzierten Mundspeichels.

Datum 1910	Nr. 1 Männlich	Nr. 2 Weiblich	Nr. 3 Weiblich	Anmerkung
$6^h\,40'$ nachm. 17. XI.	$D_{30'}^{38°}$ 320	$D_{30'}^{38°}$ 160	$D_{30'}^{38°}$ 160	
18. „	„ 160	„ 160	„ 160	
19. „	„ 160	„ 320	„ 640	
22. „	„ 160	„ 320	„ 160	
24. „	„ 160	„ 160	„ 320	

Wenn wir einen Blick auf die obigen Tabellen werfen, so können wir finden, daß meine Ergebnisse von denen von Schüle und Müller stark abweichen. Die beiden Autoren sind nämlich der Ansicht, daß die diastatische Wirkung vor der Mahlzeit gewöhnlich schwächer ist als nach derselben, und daß ihr Maximum vor dem Mittagsessen erreicht wird. Ich finde aber in der diastatischen Kraft keinen Unterschied zwischen dem vor und unmittelbar nach dem Mittagsessen produzierten und dem nach dem Frühstück und noch in jeder Vormittagsstunde sezernierten Mundspeichel. Wie wir schon aus Tabelle A und B gesehen haben, schwankt $D_{30'}^{38°}$ auf den Tabellen C und D auch zwischen 160 und 640.

Weil einerseits Hofbauer 4 Stunden nach der Mittagsmahlzeit eine bedeutende Steigerung, andererseits Schüle und Müller zwischen 11 und 3 Uhr das Maximum der diastatischen Kraft gefunden haben, nahm ich, um mir über diesen Punkt Aufschluß zu verschaffen, weiterhin folgenden Versuch vor: Ich bediente mich auch hier des Mundspeichels der oben genannten 3 Personen; sie hatten 5 Tage lang stets Punkt 12 Uhr die Mittagsmahlzeit genommen, dann wurde ihr Speichel täglich 5mal um dieselben Stunden (1, 2, 3, 4 und 6 Uhr) gesammelt und geprüft.

Ich habe weiter durch 5 Tage den Speichel unmittelbar vor und nach dem Abendessen, das pünktlich um 7 Uhr genommen wurde, und noch um 8, 9 und 10 Uhr geprüft. Zuletzt stellte ich noch einen Versuch mit dem Speichel von den 3 Personen an, um zu sehen, was für eine Wirksamkeit der nach einmaligen Einschlafen produzierte Mundspeichel entfaltet. Zu

dem Zwecke gingen die Personen regelmäßig um 9 Uhr 30 Minuten zu Bett, danach wurden sie in zwei Nächten um 12 Uhr, in drei Nächten um 1 Uhr aufgeweckt, um ihnen den Speichel zu entnehmen.

Aus den oben genannten drei verschiedenen Versuchen geht hervor, daß auch hier $D_{30'}^{38°}$ zwischen 160 und 640 (meist 160) schwankt. Daraus schließe ich folgendes:

Die diastatische Energie des Mundspeichels schwankt vom nüchternen Zustand des Morgens bis nach dem Schlafe stets in nahezu bestimmten Grenzen, gleichgültig, ob bei nüchternem oder vollem Magen, ob vor und nach der Nahrungsaufnahme, ob am Vor- oder Nachmittag oder bei Nacht.

2. Übt die Art der Nahrung auf die diastatische Kraft einen Einfluß aus?

3. Wie gestaltet sich das Verhältnis zwischen dem Quantum des produzierten Speichels und der diastatischen Energie?

Um zu wissen, welchen Einfluß die Art der Nahrung auf die diastatische Wirkung ausübt, gab ich den 3 Personen 10 Tage lang ausschließlich vegetabilische Kost, und die Untersuchung des Speichels dauerte vom 3. Tage an 1 Woche. Wie ich schon betont habe, ist die diastatische Energie vom Morgen bis zum Abend und noch weiter bis zur Mitternacht stets dieselbe (abgesehen von minimalen Schwankungen!), doch wurde der Speichel immer nachmittags zwischen 3 und 4 Uhr gesammelt und geprüft. Das Resultat gebe ich in umstehender Tabelle (II A) wieder.

Nach Abschluß dieses Versuchs wollte ich die diastatische Kraft des Mundspeichels von den 3 Personen bei animalischer Kost prüfen. Weil sie alle jedoch die animalische Kost nicht länger als 3 Tage ertragen konnten, so mußte ich den Versuch leider unterbrechen und an mir selbst mit meinem eigenen Mundspeichel fortsetzen. Dazu nahm ich vom 3. Tage vor Beginn des Versuchs an, der 1 Woche dauerte, 3mal täglich europäisches Essen; mein Speichel wurde auch nachmittags zwischen 3 und 4 Uhr gesammelt.

Ich möchte hier noch bemerken, daß die diastatische Kraft meines Mundspeichels bei wiederholter Untersuchung stets zwischen 160 und 640 schwankt und meist 160 beträgt.

Tabelle II.

A. Die diastatische Kraft des bei absoluter vegetabilischer Kost produzierten Speichels.

Datum 1910	Nr. 1 Männlich	Nr. 2 Weiblich	Nr. 3 Weiblich	Anmerkung
3h nachm. 4. XI.	$D^{38°}_{30'}$ 160	$D^{38°}_{30'}$ 640	$D^{38°}_{30'}$ 160	
3h nachm. 5. XI.	" 160	" 320	" 160	
4h nachm. 6. XI.	" 320	" 160	" 320	
3h nachm. 7. XI.	" 160	" 160	" 320	
3h 30′ nachm. 8. XI.	" 160	" 160	" 160	
3h 30′ nachm. 9. XI.	" 640	" 160	" 160	
3h 30′ nachm. 10. XI.	" 160	" 160	" 320	

Tabelle II.

B. Die diastatische Kraft des bei animalischer Kost produzierten Speichels.

Datum 1910	Männlich	Anmerkung
3h nachm. 13. XI.	$D^{38°}_{30'}$ 160	36 Jahre alt
3h 30′ nachm. 14. XI.	" 160	
4h nachm. 15. XI.	" 320	
3h nachm. 16. XI.	" 160	
4h nachm. 17. XI.	" 640	
3h nachm. 18. XI.	" 160	
3h nachm. 19. XI.	" 160	

Wenn man das Resultat in Tabelle II, besonders A (Die diastatische Kraft des bei 10 Tage langer vegetabilischer Kost produzierten Mundspeichels) betrachtet, so kann man daraus ersehen, daß die diastatische Kraft bei der 21maligen Untersuchung 14mal 160, 5mal 320 und 2mal 640, also auch hier

meist 160 beträgt und nur selten zwischen 320 und 640 schwankt.

Zieht man dann Tabelle II B (Die diastatische Energie des bei 10 Tage langer animalischer Kost sezernierten Speichels) in Betracht, so kann man, obwohl der Versuch ungenügend und die Kost dabei keine absolute animalische war (es war doch gegen die absolute vegetarische Nährung natürlich ein großer Unterschied!), auch bei animalischer Kost außer den gewöhnlichen physiologischen Tagesschwankungen keinen wesentlichen Unterschied in der diastatischen Kraft des Speichels nach den Tageszeiten konstatieren.

Also mein Ergebnis stimmt mit dem von Wohlgemuth, wonach die Art der Nahrung ohne Einfluß auf die Verdauungskraft ist, ganz überein.

Da ich festgestellt habe, daß Gewürze, z. B. Ingwer, Meerrettich, Senf usw. auf die diastatische Kraft des Mundspeichels großen Einfluß haben, so untersuchte ich wiederholt den Mundspeichel, der unmittelbar oder 1 Stunde nach Einnahme einer größeren Menge solcher Substanzen mit der Kost gesammelt wurde.

Die Substanzen blieben aber ohne Einfluß auf die diastatische Kraft, nur daß unmittelbar nach Einnahme die Sekretion des Speichels etwas zunahm.

Wie Fricker konnte ich auch bestätigen, daß die Speicheldrüse durch äußere Reize, z. B. Tabakrauchen, angeregt wird.

Ich habe deshalb den Mundspeichel über 15 mal geprüft, der unmittelbar oder 1 Stunde nach ziemlich starkem Rauchen gewonnen wurde, und gefunden, daß $D^{38^\circ}_{30'}$ stets zwischen 160 und 640 schwankt. Ferner ergaben wiederholte Prüfungen während des Rauchens selbst dasselbe Resultat, trotzdem die Menge des sezernierten Speichels bedeutend vermehrt war.

Ich konnte also auch auf diese Weise beweisen, daß die diastatische Energie unabhängig von dem Quantum des Speichels immer fast denselben Wert beibehält. Zur Unterstützung dieser Beweisführung hatte ich im Laufe meiner Untersuchungen zufällig Gelegenheit, einer Versuchsperson 2 mal Pilocarpin einzuspritzen und den darauf gewonnenen Speichel auf seine diastatische Kraft zu prüfen. Auch hier kam, trotzdem das

Quantum der produzierten Speichelflüssigkeit recht stark vermehrt war, $D_{30'}^{38°}$ 160 bis 640 heraus. Natürlich muß man reine Speichelflüssigkeit erst von dem Schleim zu trennen suchen, der bei Pilocarpingabe stets in großer Menge von der Mundhöhle und dem Rachen zusammenfließt. Sonst kann man nie zu einem zuverlässigen Resultate gelangen.

Im Gegensatz hierzu nahm der Speichel von Kranken, die Atropin (Ext. Belladonnae) täglich einnahmen, an Menge ziemlich stark ab. Trotzdem wies sein Fermentgehalt gar keinen Unterschied vom normalen Zustand auf.

Im folgenden das Resultat meiner Untersuchung über die diastatische Kraft und das Quantum des Speichels an 5 Kranken, die ziemlich lange Zeit täglich Ext. Belladonnae eingenommen haben:

Tabelle IIC.

Nr.	Dauer der Einnahme v. Ext. Belladonnae Tage	Quantum d. in 20 Min. produziert. Speichels ccm	Diastatische Kraft	Anmerkung
1. Weiblich	7	3,0	$D_{30'}^{38°}$ 160	Dosis des Ext. Belladonnae 0,05 täglich
2. „	14	2,5	„ 160	
3. Männlich	21	2,8	„ 160	
4. Weiblich	24	3,5	„ 160	
5. Männlich	32	2,9	„ 160	

Da im normalen Zustande in 20 Minuten 4 bis 8 ccm Speichel ausfließt, so zeigt das Speichelquantum der Individuen, die täglich Ext. Belladonnae eingenommen haben, große Verminderung. Trotzdem hat D stets denselben Wert, wie es aus der Tabelle ersichtlich ist. Hieraus kann man folgendes schließen:

Die diastatische Kraft des Mundspeichels ist von der Art der Nahrung und der Menge des abgesonderten Speichels unabhängig.

4. Hat die diastatische Kraft nach Geschlecht und Lebensalter einen Unterschied in der Stärke?

5. Ist die diastatische Kraft bei Gesunden und Kranken verschieden?

Von dem männlichen Geschlechte habe ich außer den genannten beiden, deren einer ich selbst bin, 19 Individuen im

Alter von 11 bis 78 Jahren als Versuchsobjekte benutzt und ihren Speichel nachmittags um 3 bis 4 Uhr gesammelt und je 5 mal geprüft. Die Resultate sind im folgenden verzeichnet:

Tabelle III.

A. Männlich.

Nr.	Lebensjahr	Diastatische Kraft	Anmerkung
1	11.	$D^{38°}_{30'}$ 4 mal 160 1 „ 640	Gesund
2	13.	„ 3 mal 160 1 „ 320 1 „ 640	Beriberi
3	17.	„ 3 mal 160 2 „ 320	Anchylostomiasis
4	18.	„ 4 mal 160 1 „ 320	„
5	21.	„ 5 mal 160	„
6	22.	„ 4 mal 160 1 „ 640	Hyperacidität
7	23.	„ 3 mal 160 2 „ 320	„
8	29.	„ 3 mal 160 2 „ 640	Ulcus ventriculi
9	35.	„ 4 mal 160 1 „ 640	Gesund
10	36.	„ 3 mal 160 1 „ 320 1 „ 640	„
11	39.	„ 5 mal 160	Anadenia ventriculi
12	43.	„ 2 mal 160 2 „ 320 1 „ 640	Hyperacidität
13	57.	„ 5 mal 160	Enteritis chronica
14	58.	„ 4 mal 160 1 „ 640	Anadenia ventriculi
15	60.	„ 5 mal 160	Pyloruscarcinom
16	61.	„ 4 mal 160 1 „ 320	Pylorusgeschwür
17	63.	„ 4 mal 160 1 „ 320	Anchylostomiasis
18	68.	„ 3 mal 160 1 „ 320 1 „ 640	„
19	69.	„ 5 mal 640	„
20	70.	„ 4 mal 160 1 „ 640	„
21	78.	„ 3 mal 160 2 „ 640	Arteriosklerose

Tabelle III.

B. Weiblich.

Nr.	Lebensjahr	Diastatische Kraft	Anmerkung
1	9.	$D_{30'}^{38°}$ { 1 mal 160, 2 „ 320, 2 „ 640 }	Tonsillenhypertrophie
2	10.	„ { 4 mal 160, 1 „ 320 }	Catarrhus intestinalis acutus
3	11.	„ { 3 mal 160, 1 „ 320, 1 „ 640 }	Anchylostomiasis
4	15.	„ { 4 mal 160, 2 „ 640 }	„
5	17.	„ { 2 mal 160, 3 „ 320 }	Gesund
6	19.	„ { 3 mal 160, 2 „ 320 }	„
7	20.	„ { 3 mal 160, 1 „ 320, 1 „ 640 }	Magenatonie
8	21.	„ { 4 mal 160, 1 „ 320 }	Anchylostomiasis
9	23.	„ 5 mal 160	„
10	29.	„ { 1 mal 160, 4 „ 320 }	Hyperacidität
11	31.	„ { 4 mal 160, 1 „ 320 }	„
12	35.	„ { 4 mal 160, 1 „ 320 }	Magengeschwür
13	37.	„ { 3 mal 160, 2 „ 320 }	Anchylostomiasis
14	39.	„ { 3 mal 160, 1 „ 320, 1 „ 640 }	„
15	40.	„ { 4 mal 160, 1 „ 320 }	Hyperacidität
16	41.	„ 5 mal 160	Anadenia ventriculi
17	42.	„ 5 mal 160	Arteriosklerose
18	48.	„ { 4 mal 160, 1 „ 640 }	Beriberi
19	49.	„ { 3 mal 160, 2 „ 320 }	Anchylostomiasis
20	52.	„ { 3 mal 160, 1 „ 320, 1 „ 640 }	Hyperacidität
21	56.	„ { 2 mal 160, 1 „ 640, 2 „ 320 }	Pyloruscarcinom

Tabelle III (Fortsetzung).

Nr.	Lebensjahr	Diastatische Kraft	Anmerkung
22	67.	$D^{38°}_{30'}$ { 3 mal 160, 2 „ 320 }	Anadenia ventriculi
23	71.	„ { 4 mal 160, 1 „ 320 }	Anchylostomiasis
24	75.	„ { 3 mal 160, 1 „ 320, 1 „ 640 }	Gesund
25	81.	„ { 4 mal 160, 1 „ 320 }	„

Von dem weiblichen Geschlechte untersuchte ich 25 Individuen im Alter von 9 bis 81 Jahren, von denen 2 bereits oben genannt sind. Ihr Speichel wurde, wie bei den männlichen Versuchspersonen, zu denselben Stunden je 5 mal geprüft. Im vorstehenden sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Aus der obigen Tabelle geht deutlich hervor, daß in der diastatischen Kraft kein Unterschied zwischen dem männlichen und weiblichen Geschlecht besteht.

Wie es aber mit der diastatischen Kraft bei Individuen unter 9 Jahren und über 81 Jahren steht, kann ich vor der Hand aus Mangel an Material nicht entscheiden. Nach Bidder und Schmidt[1]) sollen die Fermente bei menschlichen Neugeborenen nur in der Parotis, und zwar in sehr spärlicher Menge vorhanden sein, und ich habe auch einst berichtet, daß der Gehalt aller menschlichen Organe an Diastase desto geringer ist, je weniger Zeit nach der Geburt verstrichen ist.

Hieraus können wir vermuten, daß die Diastasemenge des Mundspeichels bei Neugeborenen und Säuglingen geringer ist als bei Erwachsenen.

Wie erwähnt, betrug der D-Wert des Speichels der 46 Personen, die 9 bis 81 Jahre alt sind, als Minimum 160 und als Maximum 640, und hieraus kann man wohl den Schluß ziehen, daß die diastatische Energie unseres Speichels zwischen 160 und 640 schwankt.

Es ist noch zu bemerken, daß unter den genannten 46 Personen, denen ich[2]) den Speichel zur Untersuchung entnahm,

[1]) Bidder und Schmidt, Verdauungssäfte. Mitau u. Leipzig 1852.
[2]) Hirata, diese Zeitschr. 27, 385, 1910.

nur 7 als gesund galten, während die anderen Kranke waren, die ich in meiner Sprechstunde untersuchte.

Von diesen litten:

2 Personen	an	Arteriosklerose,
1 Person	„	Tonsillenhypertrophie,
9 Personen	„	Hyperacidität,
1 Person	„	Enteritis acuta,
4 Personen	„	Anadenia ventriculi,
4 „	„	Ulcus ventriculi,
2 „	„	Carcinoma pylori,
1 Person	„	Enteritis chronica,
2 Personen	„	Beriberi,
1 Person	„	Ulcus pylori,
11 Personen	„	Anchylostomiasis,
1 Person	„	Atonia ventriculi.

Hieraus können wir ersehen, daß der Speichel, der den genannten 39 Patienten bei 12 verschiedenen Krankheiten entnommen wurde, gegen den der gesunden Personen keinen Unterschied in der diastatischen Kraft aufweist, und daß er sowohl bei enorm gesteigerter Absonderung von freier Salzsäure (Hyperacidität) als auch bei völligem Fehlen von Magensaft (Anadenie) immer denselben Wert beibehält. Ferner hat die Motilität des Magens keinen Einfluß auf die diastatische Energie, wie bei Achylia oder Pyloruscarcinom.

Ich möchte als Beispiel dafür nur einen Fall anführen, bei dem der 1 Stunde nach dem Probefrühstück gewonnene Magensaft trotz beträchtlich hohem Gehalt an Salzsäure dieselbe diastatische Kraft entfaltete wie in der Norm. Das Ergebnis der Untersuchung des Magensaftes lautete: Chymifikation gut, viel Schleim, freie Salzsäure 81, Gesamtacidität 99.

Ich habe weiter noch den Mundspeichel von 13 anämischen Patienten wiederholt untersucht, um zu sehen, welche Beziehungen zwischen Hämoglobingehalt und diastatischer Kraft vorhanden sind.

Das Resultat zeigt nebenstehende Tabelle IV.

Bei dem Speichel von den 13 anämischen Patienten mit ziemlich niedrigem Hämoglobingehalt schwankte D auch zwischen 160 und 640; die diastatische Kraft muß also vom Hämoglobingehalt ganz unabhängig sein.

Ich hatte zufällig Gelegenheit, bei 3 Frauen vor, während oder nach der Menstruation ihren Speichel wiederholt zu prüfen.

Tabelle IV.

Nr.	Hämogloblingehalt (nach Sahli) %	Diastatische Kraft
1	40	$D^{38°}_{30'}$ 160
2	60	" 160
3	64	" 160
4	60	" 160
5	63	" 320
6	77	" 160
7	50	" 160
8	65	" 160
9	57	" 160
10	65	" 640
11	50	" 160
12	35	" 320
13	48	" 320

Da die diastatische Kraft ihres Speichels keine Besonderheiten gezeigt hat, so kann man sagen, daß sie von den Menses unbeeinflußt bleibt.

Daraus schließe ich folgendes: Die diastatische Kraft des Mundspeichels ist von Geschlecht, Lebensalter und Gesundheit ganz unabhängig, und der D-Wert schwankt stets zwischen 160 und 640. Hämoglobingehalt und Menstruation üben auch keinen Einfluß auf die diastatische Energie aus.

Obwohl über den Fermentgehalt des pathologisch veränderten Speichels meines Wissens schon Salkowski[1]), Simon[2]), Pini[3]) usw. Prüfungen angestellt haben, so kann ich doch wegen Verschiedenheit der Versuchsobjekte ihre Resultate leider nicht mit den meinigen vergleichen.

Wenn man meine Resultate betrachtet, kann man daraus folgenden Schluß ziehen:

Meine Resultate decken sich mit denen von Wohlgemuth bloß in dem Punkte, daß die diastatische Kraft des Mundspeichels von der Art und dem Quantum der Nahrung unabhängig ist und daß sie keine Tagesschwankung aufweist, in anderen Punkten aber konnte ich die Resultate der Autoren nicht bestätigen.

1) E. Salkowski, Virchows Archiv 109, 358, 1887.

2) Simon, Journ. of Physiol. 9, 261, 1907.

3) Pini, Clinica moderna 1907.

Da die diastatische Kraft unseres Speichels zwischen 160 und 640 schwankt, so dürfte man diese Schwankung wohl als die physiologische betrachten.

Hier möchte ich noch hinzufügen, daß bei meinen Untersuchungen der D-Wert stets etwas höher ist als bei denen von Wohlgemuth, trotzdem wir uns beide derselben Untersuchungsmethode bedienten. Wohlgemuth hat nämlich als Minimum für 60 Minuten $D^{38°}_{30'}$ 125, als Maximum $D^{38°}_{30'}$ 780 gefunden, während bei meinen Untersuchungen für 30 Minuten schon als Minimum $D^{38°}_{30'}$ 160, als Maximum $D^{38°}_{30'}$ 640 herauskam.

Die Prüfungen der diastatischen Kraft für 60 Minuten, wie bei Wohlgemuth, ergaben bei mir folgendes Resultat:

Tabelle IV.

Nr.	Erste Prüfung	Zweite Prüfung	Dritte Prüfung
1. Männlich	$D^{38°}_{60'}$ 320	$D^{38°}_{60'}$ 320	$D^{38°}_{60'}$ 320
2. Weiblich	„ 640	„ 320	„ 320
3. „	„ 320	„ 320	„ 640

Wenn man die Tabelle betrachtet, so ersieht man, daß das Minimum der diastatischen Kraft in meinen Versuchen fast zweimal so groß ist wie in denen von Wohlgemuth. Wie nun ein solcher Unterschied zustande kommt, das mag, wie ich vermute, folgenden zwei Gründen zuzuschreiben sein:

1. Der Speichel von uns Japanern, die an eine amylaceenreichere Kost gewohnt sind, als die Europäer, besitzt wahrscheinlich eine etwas höhere diastatische Kraft. Die Tatsache, daß der Speichel der Carnivoren reicher an Fermenten ist als der der Herbivoren, ist ja schon bekannt, und obwohl ich in Tabelle II, A und B, betont habe, daß die Art der Nahrung auf die diastatische Kraft ohne Einfluß ist, so darf man doch dabei den Rassenunterschied und den vorübergehenden Nahrungswechsel nicht außer acht lassen.

Hierüber müßte man noch Versuche an größerem Material anstellen, um zu einem endgültigen Urteil zu gelangen.

2. Bei meinen Untersuchungen brachte ich eine bestimmte Anzahl von Reagensgläsern in ein Wasserbad von bestimmter Temperatur, und nachdem die Temperatur in den Reagens-

gläsern auf 38° gestiegen war, ließ ich diese 30 Minuten im Wasserbad stehen, so daß ich im ganzen ungefähr 40 Minuten brauchte.

Zusammenfassung.

1. Die diastatische Kraft des Mundspeichels behält durch den ganzen Tag ungefähr denselben Wert. Sie schwankt nur in minimalem Grade.

2. Die diastatische Kraft des Mundspeichels bleibt von der Mahlzeit und der Art der Nahrung stets unbeeinflußt.

3. Die diastatische Kraft ist von dem Quantum des ausfließenden Speichels ganz unabhängig.

4. Auf die diastatische Kraft üben Geschlecht und Lebensalter, abgesehen von den Säuglingen, keinen Einfluß aus.

5. Die diastatische Kraft ist, wenigstens bei gewissen Kranken, von demselben Wert wie bei Gesunden. Der Hämoglobingehalt bleibt auch auf die diastatische Kraft ohne Einfluß.

6. Die diastatische Kraft des Speichels, wenigstens bei uns Japanern, schwankt zwischen $D^{38°}_{30'}$ 160 und 640.

Während der Korrektur dieser Arbeit las ich die Arbeit von H. Litomanowicz und Eduard Müller[1]). Sie kamen zu dem Schlusse: „Es fehlen Tagesschwankungen, ebenso sind ohne Einfluß: Lebensalter, Geschlecht, Hungerzustände, Art der Nahrung." Also ihr Resultat stimmt mit dem meinigen vollkommen überein.

---

[1]) H. Litomanowicz und E. Müller, Centralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffw. **10**, 81—107. (Ref. im Jahresber. über d. Fortschr. d. Tierchem. **39**.)

Über die Carboxylase bei höheren Pflanzen.

Von

W. Zaleski und Elisabeth Marx.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Charkow.)

(Eingegangen am 27. Oktober 1912.)

Die interessanten Untersuchungen von Neuberg[1]) haben gezeigt, daß lebende und abgetötete Hefen ein besonderes Ferment, die Carboxylase, enthalten, das Brenztraubensäure in Kohlendioxyd und Acetaldehyd spaltet. Neuberg und Kerb[2]) nahmen an, daß Brenztraubensäure ein Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung darstellt.

Nachdem P. Mayer[3]) sowie M. Tschernorutzki[4]) in Neubergs Laboratorium die Umwandlung der Brenztraubensäure auch im tierischen Organismus nachgewiesen haben, ist es wichtig, zu untersuchen, ob auch die höheren Pflanzen Brenztraubensäure zu spalten vermögen.

Unsere Versuche wurden mit fein zerriebenen Erbsensamen in der Luft und im Wasserstoff ausgeführt. Das Pulver der Samen wurde mit destilliertem Wasser und parallel dazu mit der 1%igen Lösung von brenztraubensaurem Natrium befeuchtet. Die Lösungen, die zum Befeuchten des Pulvers dienten, wurden mit Toluol (4%) versetzt und außerdem wurde durch den Rezipienten während des Versuches ein Toluolstrom hindurchgeleitet. Die von den Objekten ausgeschiedene Kohlensäure wurde durch Bariumhydroxydlösung absorbiert[5]).

---

[1]) C. Neuberg und L. Karczag, diese Zeitschr. 36, 60, 68 und 76, 1911.

[2]) C. Neuberg und J. Kerb, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 1, 114, 1912.

[3]) P. Mayer, diese Zeitschr. 40, 441, 1912.

[4]) M. Tschernorutzki, diese Zeitschr. 43, 486, 1912.

[5]) Die Versuche wurden bei 12 bis 13° R ausgeführt.

Versuche 1 bis 4.

CO_2 für 5 g Erbsenpulver pro 21 bis 22 Stunden in Milligramm:

Wasser	12,75	12,1	10,4	7,8
Brenztraubensaures Natrium .	41,25	40,8	43,5	37,4

Versuche 5 bis 6.

CO_2 für 5 g Erbsenpulver pro 22 Stunden in Milligramm im Wasserstoff:

Wasser	13,0	13,2
Brenztraubensaures Natrium . .	44,2	52,2

Versuche 7 bis 8.

Das Pulver der Erbsensamen wurde mit einer 1%igen Lösung von brenztraubensaurem Natrium befeuchtet.

CO_2 für 5 g pro 22 Stunden in Milligramm:

Luft	38,2	40,0
Wasserstoff .	35,6	40,8

Nach dem Zusatz von Brenztraubensäure wird die CO_2-Produktion der abgetöteten Erbsensamen sehr stark befördert. Weder alkalische Phosphate noch Zymin- und Hefanolextrakte können eine solche Vermehrung der CO_2-Produktion bei den Erbsensamen hervorrufen[1]). Die postmortale CO_2-Produktion der Erbsensamen geht auf Kosten der Brenztraubensäure in der Luft und im Wasserstoff mit gleicher Energie vor sich.

Wir werden später auf die Frage über die Rolle der Carboxylase in der Atmung der Pflanzen zurückkommen, da unsere Versuche über die Beziehung derselben zur Alkoholgärung noch nicht zu Ende gekommen sind.

[1]) W. Zaleski und A. Reinhard, diese Zeitschr. 27, 450, 1910; 35, 228, 1911; W. Zaleski und Elisabeth Marx, ibid. 43, 1, 1912.

Über die photochemische Synthese der Kohlenhydrate.

Richtigstellung der Bemerkungen von Walther Löb.

Von

Julius Stoklasa, J. Šebor und W. Zdobnický.

(Eingegangen am 7. November 1912.)

W. Löb versuchte im 5. und 6. Heft des 43. Bandes dieser Zeitschrift (1912) abermals glaubhaft zu machen, daß ihm die Priorität bei der photochemischen Synthese der Kohlenhydrate gebühre. Er beklagt sich dortselbst, daß wir in unserer jüngsten Arbeit „Über die photochemische Synthese der Kohlenhydrate unter Einwirkung der ultravioletten Strahlen"[1]) auf seine sachlichen Einwände mit keinem Wort reagierten. Dies ist jedoch in keiner Weise richtig, denn auf den Seiten 361 bis 363 (also auf 3 Seiten) unserer Arbeit wurde von uns völlig klargelegt, daß Löbs Experimente mit den unserigen gar nichts gemein haben. Dort heißt es ausdrücklich, daß er unter der Einwirkung stiller elektrischer Entladungen aus Kohlenoxyd, Wasser und Wasserstoff Glykolaldehyd erhalten habe, während wir unter dem Einflusse ultravioletter Strahlen der Quecksilberquarzlampe aus Kohlendioxyd und Wasserstoff in statu nascendi Zucker bekamen.

Löb versucht, seine bei der Bildung des Glykolaldehyds aus feuchtem Kohlenoxyd und Wasserstoff erhaltenen Resultate auf die biologischen Vorgänge in der chlorophyllhaltigen Zelle zu übertragen; wir aber behaupten gemäß unseren Untersuchungen, daß Kohlenoxyd selbst in ganz geringen Quantitäten für die chlorophyllhaltige Zelle ein starkes Gift ist. Infolgedessen ist auch ein solcher Prozeß in der chlorophyllhaltigen Zelle gänzlich ausgeschlossen. In unserer Arbeit heißt es, daß derartige stille elektrische Entladungen, die Löb zu seinen Experimenten benutzte, kaum in der Natur vorkommen dürften, ferner daß die Strahlen der Quecksilberquarzlampe bei unseren Versuchen einen ganz anderen Charakter besitzen und in physikalischer und chemischer Hinsicht mit den stillen elektrischen Entladungen Löbs absolut nicht identisch sind. Überhaupt geht unsere Ansicht dahin, daß die Bildung des Formaldehyds

[1]) Julius Stoklasa, Johann Šebor und Wenzel Zdobnický, diese Zeitschr. **41**, Heft 5, 1912.

aus feuchter Kohlensäure und Wasserstoff durch die chemische Wirkung stiller elektrischer Entladungen, die Löb entdeckt haben will, durchaus nichts Neues ist, da dies ja schon fast 10 Jahre vor Löb von Losanitsch gefunden worden ist.

Auf Löbs weitere unberechtigte Vorwürfe erwidern wir folgendes:

1. Von den zwei Experimenten bezüglich der Oxydation von Formaldehyd in alkalischer Lösung haben wir das erstere in einem offenen Gefäß aufgeführt, um die Wirkung des vollen Sauerstoffzutritts zu beobachten, wobei es uns tatsächlich gelang, die Oxydation des Formaldehyds bis zu Kohlensäure festzustellen. In Anbetracht dessen, daß also die Oxydation bis zu Kohlensäure vor sich ging, konnten wir auch keine Ameisensäure erhalten. Warum sollte also, wie Löb meint, dieser Versuch falsch sein? Das ist wahrlich uns und gewiß auch vielen anderen einfach rätselhaft. Wie man aus unserer Arbeit deutlich ersieht, war es nicht nötig, Sauerstoff durchzuleiten, da ja die Oxydation so rasch verlief, daß sich Formaldehyd schnell zu Ameisensäure und diese wieder in Kohlendioxyd umwandelte.

2. Den Versuch mit einem abgeschlossenen Gasvolumen bezeichnet Löb als völlig wertlos und ist der Meinung, daß wir daselbst Sauerstoff während des Experimentes durchgeleitet haben. Dadurch beweist er eklatant, daß er unsere Arbeit nur ganz flüchtig gelesen haben kann, denn wir äußerten uns doch dahin, daß durch das Reaktionsgefäß, in dem sich das Reaktionsgemisch befindet, bloß vor dem Versuch 1 Stunde lang Sauerstoff durchgeleitet wurde, um die Luft zu verdrängen. Erst dann wurde ohne Sauerstoffdurchleitung bei abgesperrtem Apparat 7 Stunden lang belichtet. Dieser Versuch über den Verlauf der Oxydation von Formaldehyd, den Löb für gänzlich überflüssig hält, wurde von uns zu dem Zwecke ausgeführt, um die eventuelle Bildung von CO nachzuweisen und die zu CO_2 oxydierte Menge des Formaldehyds zu bestimmen. Daß Aldehyde mit Kalilauge Säuren und Alkohole liefern, ist ja längst bekannt und bedarf nicht erst des Nachweises seitens Herrn W. Löbs. Von uns wurde die Prüfung auf Methylalkohol im Destillate des Reaktionsgemisches ausgeführt, aber Methylalkohol nicht konstatiert. Es handelte sich für uns hauptsächlich darum, so weit es möglich war, die Prozesse unter der Einwirkung der ultravioletten Strahlen zu verfolgen und die Reaktionsprodukte gewichtsanalytisch zu bestimmen. Daß die Oxydation der Ameisensäure unter Einwirkung des Ozons verläuft, liegt ja klar auf der Hand, und es hat wohl niemand nötig, sich darüber erst von Herrn Löb belehren zu lassen.

3. Bezüglich der Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf Kaliumbicarbonat bei Gegenwart von Ferroverbindungen behauptet Löb, daß sich eine große Menge Wasserstoff aus Eisenoxydulsulfat in Gegenwart von Kalilauge entwickelt. Wir ließen zu 300 ccm 7%iger Kalilauge 15%ige Eisensulfatlösung zutropfen und fanden, daß sich binnen 20 Stunden bei 19 bis 20° C 1,4 ccm Wasserstoff bildete. Wir haben diesen Versuch auch bei einer höheren Temperatur, und zwar bei 50 bis 60° C, wiederholt und binnen 5 Stunden bloß 1,6 ccm

Wasserstoff konstatieren können. Allerdings ist da noch fraglich, ob das Gas auch reiner Wasserstoff war. Auch ein dritter Versuch wurde von uns unter Kohlensäuredurchleitung bei 60 bis 80° C ausgeführt und ergab ca. 0,2 ccm Wasserstoff. Wie konnte also Löb in 10 Minuten die Bildung von 13,8 ccm Wasserstoff beobachten? Das ist ja fast unmöglich und wird vermutlich ein Versuchsfehler sein! Die minimalen Quantitäten von Wasserstoff, die sich bei unseren Versuchen bildeten, können absolut nicht in Betracht gezogen werden. Die Reduktion der Kohlensäure durch freien Wasserstoff konnte also nur minimal sein und auf unsere Versuche nicht den geringsten Einfluß ausüben.

4. Weiter äußert sich Löb in seiner Kritik wie folgt: Von Interesse ist lediglich ihre Angabe, daß sie durch Polarisation ihrer Lösung eine Drehung von 0,15° im 2 dcm-Rohr erhielten. Nach ihren Mengenangaben müssen demnach etwa 24% des erhaltenen Zuckers (auf Glucose berechnet) optisch aktiv sein! Nach diesen experimentellen Befunden überrascht einigermaßen die Angabe: „Die untersuchte Lösung dieser Hexosen zeigte sich optisch inaktiv“.

Daraufhin erwidern wir, daß Löbs Berechnung der Menge angeblich optisch-aktiven Zuckers, die nach ihm 24% beträgt, an sich **grundfalsch** ist, weil Löb den Faktor für das Auerlicht 0,344 vergaß. Da die Rotation unserer Zuckerlösung sich zu $[\alpha]_D = + 4{,}5$ berechnen würde, jene bei der Glucose $[\alpha]_D = + 52{,}5$ beträgt, wäre die Menge des Zuckers (auf Glucose berechnet) 8,5%.

Unsere Experimente führten, wie in unseren Arbeiten angegeben ist, zu dem Resultate, daß die unter der Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf Kaliumbicarbonat erhaltenen Kohlenhydrate ein Gemisch von Hexosen, Aldosen bzw. Ketosen, oder deren Osone, darstellen.

Die gemessene Drehung + 0,15 liegt nun sehr nahe der Grenze der Beobachtungsmöglichkeit. Wir haben die Zahl einfach so angegeben, wie sie unseren Beobachtungen entspricht, ohne irgendeine Schlußfolgerung daraus zu ziehen. Es ist also unerklärlich, wie Herr Löb uns daraus einen Vorwurf machen kann!

Aus all den Äußerungen Löbs ist deutlich seine Tendenz zu erkennen, unsere Befunde zu entstellen und falsch auszulegen. Das beste Dokument hierfür sind seine unrichtigen Angaben, mit denen er unsere Befunde herabsetzen will. Mit den übrigen nichtssagenden Auslassungen Löbs brauchen wir uns nicht weiter zu beschäftigen; mag ein jeder, der unsere Arbeiten verfolgt, urteilen, ob sie mehr zur Lösung des Problems der photochemischen Assimilation der Kohlensäure in der chlorophyllhaltigen Zelle beitragen oder die Versuche W. Löbs mit seinen „stillen elektrischen“ Entladungen.

Beiträge zur Chemie und zur quantitativen Bestimmung des Leimes.

Von

M. Berrár.

(Aus dem Physiologischen Institut der tierärztlichen Hochschule in Budapest.)

(Eingegangen am 24. Oktober 1912.)

Einleitung.

In sämtlichen Organen des Tierkörpers, hauptsächlich in den verschiedenen Bindegeweben, sowie auch in den Knorpeln und Knochen kommt Collagen vor. Gewöhnlich ist dasselbe in Form feiner Fasern zu finden und bildet den Hauptbestandteil der Sehnen, Bänder und Bindegewebsmembranen; außerdem findet man es in großer Menge in den Knochen, Knorpeln, in der Haut und in den Schleimhäuten; in geringerer, summarisch jedoch bedeutender Masse ist es in dem interstitiellen Bindegewebe, das bis zu den die Gewebe bildenden Elementen dringt, vorhanden. Eine mit den Albuminoiden und daher in einem gewissen Grade mit dem Collagen verwandte Substanz ist das Plastin, das im Protoplasma und auch im Kerne der Zellen vorkommt und dessen netzförmige Stütze bildet[1]).

Das Collagen wird mit Wasser gekocht zu Leim. Leim kommt unter gewöhnlichen Umständen weder im Blut noch in den Gewebssäften und in den Organen vor, wenigstens sind solche Beobachtungen nicht bekannt. Hingegen in besonderen Fällen, namentlich wenn wir Leim in eine Vene injizieren, ist derselbe im Blute längere Zeit nachweisbar, und der inzwischen ausgeschiedene Harn ist auch leimhaltig[2]) [3]) [4]) [5]).

---

[1]) Ruzička, Arch. f. Zellforsch. 1, 587, 1908.

[2]) Klug, Az enyv, mint tápanyag (ungarisch). Budapest 1890.

[3]) Freund und Popper, diese Zeitschr. 15, 272, 1909.

[4]) Gawriloff, Die Ausscheidung des Leimes durch die Nieren (russisch). Inaug.-Diss. Kiew 1903.

[5]) Achard und Aynaud, Compt. rend. Soc. Biol. 65, H. 29, 1908.

Wenn wir in Betracht ziehen, daß neuerdings Leiminjektionen zu therapeutischen Zwecken, namentlich zur Blutstillung, empfohlen wurden, daß außerdem der im Tierkörper gewöhnlich nicht vorkommende Leim bei der Zubereitung der aus dem Tierreiche stammenden Nahrungsmittel aus dem in denselben vorhandenen Collagen sich bildet und so mit den übrigen Nährstoffen in den Verdauungskanal gelangt, ist die Frage der physiologischen Bedeutung des Leimes offenbar wichtig. Die genaue Durchführung von Experimenten dieser Art ist bis nun erheblich erschwert durch den Umstand, daß wir keine Methode kennen, mit Hilfe deren wir den Leim von einem Eiweißstoffgemisch genau trennen und dessen Menge quantitativ bestimmen könnten.

Ein Teil der bisherigen Stoffwechseluntersuchungen mit Leim geschah ohne quantitative Leimbestimmungen; sie beschränkten sich nur auf die Bestimmung des Körpergewichtes oder der Stickstoffbilanz. In einzelnen Fällen, hauptsächlich wenn man Leim subcutan oder in eine Vene injiziert, erscheint ein Teil desselben im Urin. In solchen Fällen müssen die Untersuchungen unbedingt durch Leimbestimmungen ergänzt werden, deshalb sind schon einige Verfahren beschrieben worden, mittels deren man bei Stoffwechseluntersuchungen den Leim bestimmen könnte.

Vollständig systematische Methoden für Leimbestimmungen in Gegenwart von Eiweißkörpern wurden meines Wissens nach nur zwei veröffentlicht. Das eine Verfahren empfahl Gawriloff[1]); dasselbe besteht darin, daß man aus der zu untersuchenden Substanz das Eiweiß durch 10%ige Salpetersäure ausfällt, das Filtrat mit Ammoniak neutralisiert und daraus den Leim mit Ammonsulfat ausfällt; der Niederschlag wird erst bei Zimmertemperatur, dann bei 100° getrocknet, das Ammonsulfat durch Waschen mit kaltem Wasser entfernt und der Rückstand getrocknet und gewogen.

Meine Versuche mit der durch Gawriloff empfohlenen Methode haben zu keinen günstigen Resultaten geführt. Der Grund hierfür liegt vielleicht darin, daß die Arbeit nur in russischer Sprache erschienen und daher für mich im Original unzugänglich war. Bei meinen Bestimmungen, die ich nur mit reiner Leimlösung und nicht mit einem Eiweiß-Leimgemisch anstellte, zeigten die Resultate einen Fehler von 20 bis 30%. Derselbe stammt hauptsächlich davon, daß der durch Ammonsulfat ausgefällte und bei 100° getrocknete Niederschlag beim Waschen

[1]) l. c.

mit Wasser teilweise gelöst wurde. Bei einem Versuche mit Hilfe der von Gawriloff angegebenen Methode bekam ich aus einer Leimlösung, die 0,2275 g Trockensubstanz enthielt, einen Niederschlag, dessen Trockensubstanz 0,1717 und 0,1832 g wog, der Niederschlag war aber noch immer nicht vollständig sulfatfrei.

Das zweite Verfahren stammt von Beckmann[1]), der für die Bestimmung des Leimes in Anwesenheit von Peptonen das Formaldehyd empfahl. Nach Behandlung mit Formaldehyd wird das Gemisch eingedampft, wobei das Pepton gelöst bleibt, das Eiweiß und der Leim in einer unlöslichen Modifikation ausgeschieden werden. Wenn wir das Eiweiß in einer anderen Probe durch Kochen mit Salpetersäure fällen und gesondert bestimmen, gibt die Differenz zwischen beiden Niederschlägen das Quantum des Leimes. Bei dieser Methode ist also die gesonderte Bestimmung des Eiweißes nötig; es ist aber bekannt — und diesen Fehler hat auch die Methode Gawriloffs —, daß ein Kolloid aus der Lösung eines anderen, hydrophilen Kolloids nur schwer ausfällbar ist. Die Unzuverlässigkeit der Methode wurde übrigens neuestens durch Greifenhagen, König und Scholl[2]) überzeugend bewiesen. Die Genannten haben auch mit anderen, zu Leimbestimmungen empfohlenen Reagentien Versuche angestellt und gelangen zum Schlusse, daß es an einer zuverlässigen Methode für quantitative Leimbestimmungen noch immer mangelt.

Das neueste Verfahren für diesen Zweck veröffentlichte E. Schmidt[3]). Dasselbe beruht auf der Beobachtung, daß der Leim durch Ammonmolybdat in Gegenwart von Säure selbst aus sehr verdünnten Lösungen gefällt wird. Da aber der Leim mit dieser Methode selbst aus reiner wässeriger Lösung nur mit einem Fehler bis zu 6 % gewonnen werden konnte, und außerdem auch arabisches Gummi, das Extrakt des Leinsamens und das Eiweiß, wenn auch in geringerem Maße, durch dieses Reagens gefällt werden, so ist dieses Verfahren zur Trennung des Leimes vom Eiweiß nicht brauchbar.

Aus diesen Gründen setzte ich mir das Studium einiger Punkte der Leimchemie zum Ziele, und zwar, da mein Hauptbestreben darauf gerichtet war, womöglich ein Verfahren zu suchen, mit dessen Hilfe man den Leim von jeder Art Eiweiß trennen könnte, zog ich in erster Reihe die Lösungs- und Fällungsverhältnisse des Leimes in Betracht; nachher war ich bestrebt, die gewonnenen Erfahrungen für die quantitative Analyse zu verwerten.

---

[1]) E. Beckmann, Biochem. Centralbl. **2**, 898, 1894.
[2]) Diese Zeitschr. **35**, 216, 1911.
[3]) E. Schmidt, Chem.-Zeitg. **34**, 839, 1910.

Die Lösungsverhältnisse des Leimes.

In der Literatur findet man oft die Ansicht vertreten, daß der Leim in kaltem Wasser unlösbar sei[1]). Da ich beobachten konnte, daß nach dem Übergießen mit Wasser die über dem Leim befindliche Flüssigkeit sofort eine Leimreaktion gibt, habe ich in der folgenden Versuchsreihe etwa 2 g reine französische Gelatine mit 200 ccm destilliertem Wasser übergossen und nahm von Zeit zu Zeit Proben aus der Lösung, deren Trockensubstanz bestimmt wurde.

Tabelle I.

Versuch	Probe ccm	Zeit	Trockensubstanz g
1	20	15 Min.	0,0058
2	20	1 Std.	0,0126
3	20	2 "	0,0162
4	20	3 "	0,0174
5	20	4 "	0,0167
6	20	5 "	0,0181
7	20	6 "	0,0174
8	20	18 "	0,0213
9	20	24 "	0,0254

Der Leim erwies sich also lösbar, und die Konzentration der Lösung nahm mit der Zeit zu. Einzelne Unregelmäßigkeiten kamen vor, besonders im 7. Experiment, in dem der Leimgehalt nach 7 Stunden geringer war als eine Stunde vorher. Den Grund der Unregelmäßigkeiten suchte ich in den Schwankungen der Temperatur, und deshalb ist in den folgenden Versuchen die Temperatur auch bestimmt; die Verhältnisse waren sonst den vorigen ähnlich.

Tabelle II.

Versuch	Zeit Std.	Temperatur °C	Probe ccm	Trockensubstanz g	%
1	1	23	20	0,0157	0,08
2	2	23	20	0,0237	0,12
3	3	23	20	0,0328	0,16
4	4	23	20	0,0381	0,19
5	5	23	20	0,0458	0,23
6	6	23	20	0,0536	0,27
7	18	23	20	0,0850	0,42
8	42	23	20	0,1164	0,58
9	66	21	20	0,1239	0,62
10	80	21	20	0,1240	0,62

[1]) N. Zuntz und A. Loewy, Lehrbuch der Physiologie des Menschen. Leipzig 1909.

Aus diesen Versuchen erhellt also, daß sich der Leim bei Zimmertemperatur allmählich löst, das Lösen mit der Zeit parallel geht, schließlich aber um eine Konzentration von 0,62 °/₀ konstant bleibt; die Lösung ist also gesättigt. Zur Konstatierung, ob die Temperatur tatsächlich die Konzentration beeinflußt, erniedrigte ich in den folgenden Versuchen die Temperatur.

Tabelle III.

Versuch	Zeit Std.	Temperatur ° C	Probe ccm	Trocken-substanz g	°/₀
10	80	21	20	0,1240	0,62
11	104	18	20	0,1192	0,60
12	128	17	20	0,1122	0,56

Es ist also offenbar, daß die Temperatur auf die Lösung des Leimes einen auffallenden Einfluß ausübt; in derselben Leimlösung, die bei 21° 0,1240 g, d. h. 0,62 °/₀ Leim gelöst enthielt, waren bei 18° nur 0,1192 g, d. h. 0,60 °/₀, und bei 17° nur 0,1122 g, also 0,56 °/₀ gelöster Leim. Aus einer gesättigten Leimlösung, die mit festem Leim in Berührung bleibt, wird also ein Teil des gelösten Leimes beim Sinken der Temperatur ausgeschieden.

Es ist interessant, daß sich vom Leim in Wasser bei 21° 0,62 °/₀ löst; man kann beobachten, daß eine warm bereitete und filtrierte Leimlösung von 0,7 °/₀iger Konzentration nach dem Erkalten während dem Stehen bei derselben Temperatur schon eine dünne Gallerte bildet: die obere Grenze der Löslichkeit ist also annähernd übereinstimmend mit der unteren Grenze des Gelatinierungsvermögens.

Die Fällungsverhältnisse des Leimes.

Der Leim wird durch folgende Reagenzien ausgefällt:

Salze der Alkali- und Erdmetalle, $(NH_4)_2SO_4$, bei Sättigung[1]),

Alkohol,

Metaphosphorsäure[2]) und Chromsäure, organische Säuren, z. B. Tannin, Pikrinsäure[1]),

[1]) Klug, l. c.

[2]) Beilstein, Handbuch der organischen Chemie. Hamburg und Leipzig 1899.

molybdänsaures Ammoniak (aus saurer Lösung[1])),

Mercurisalze (aus saurer Lösung)[2]),

Platinchlorid[2]), Phosphorwolframsäure + Salzsäure[2]), Quecksilberjodid-Jodkalium + Salzsäure[2]);

endlich durch Eindampfen mit Formaldehyd geht er in eine unlösliche Modifikation über[3]).

Dem Aussalzen, dem Formaldehyd, dem molybdänsauren Ammoniak, Phosphorwolframsäure, Platinchlorid gegenüber zeigt der Leim ein den wirklichen Eiweißkörpern so ähnliches Verhalten, daß die Benutzung dieser Reagenzien zur Trennung der zweierlei Substanzen kein Resultat versprach; deshalb wandte ich in den Versuchen hauptsächlich Alkohol, Metaphosphorsäure, Pikrinsäure und Quecksilberjodid-Jodkalium an. Die Versuche haben zu folgenden Resultaten geführt:

Durch Alkohol wird der Leim ausgefällt, aber

1. die Reaktion ist nicht sehr empfindlich; in einer sehr dünnen Leimlösung, wo ich schon durch dreifachen Überschuß von Pikrinsäure einen Niederschlag bekam, wurde durch Alkohol selbst in fünfzigfacher Menge kein Niederschlag hervorgerufen.

2. Außerdem bildete der aus Leimlösungen durch Alkohol gewonnene Niederschlag eine feine suspensionskolloidale Lösung, die durch das Filter ging, sich selbst nach tagelangem Stehen nicht zu Boden setzte und nicht filtrierbar wurde. In einem Falle setzte sich der durch sechsfachen Überschuß des Alkohols gewonnene Niederschlag selbst nach 14 Tagen nicht zu Boden.

Durch Metaphosphorsäure wird der Leim auch gefällt, doch

1. ist diese Reaktion nicht sehr empfindlich; in einer Lösung von Leim, in der derselbe durch Pikrinsäure noch gefällt wurde, war mit 10%iger Metaphosphorsäure keine Niederschlagsbildung erreichbar.

2. Der aus Leimlösung durch Metaphosphorsäure gewinnbare Niederschlag war im Überschuß der Säure wieder löslich; beim Kochen hingegen löst sich der Niederschlag nicht.

---

1) E. Schmidt, l. c.

2) Klug, l. c.

3) E. Beckmann, l. c.

3. Das Eiweiß gibt mit Metaphosphorsäure einen Niederschlag, der im Überschusse der Säure nicht merklich löslich ist. Dies schien für die quantitative Trennung der beiden Stoffe anwendbar, um so mehr als der im Überschuß der Metaphosphorsäure gelöste Leim durch Phosphorwolframsäure wieder ausgefällt wird. Der Niederschlag ist gut filtrierbar, und das Filtrat erwies sich bei der Bestimmung mittels der Kjeldahl-Methode stickstofffrei.

Der in Metaphosphorsäure gelöste Leim ist auch durch Pikrinsäure ausfällbar, jedoch nicht vollständig, und die Menge des Niederschlags variiert je nach dem Verhältnis der beiden Säuren; beim Stehen vermehrt er sich, durch Erhitzen wird er außerordentlich leicht gelöst, der mit Pikrinsäure allein behandelte Leim löst sich hingegen nur schwer nach dem Aufkochen und Erkalten in Metaphosphorsäure.

4. In weiteren Versuchen stellte es sich heraus, daß auch Eiweiß durch Metaphosphorsäure nicht vollständig ausgefällt wird. Wenn ich zur Lösung des Eiereiweißes so viel Metaphosphorsäure goß, daß das Filtrat mit Metaphosphorsäure schon keinen weiteren Niederschlag gab, bekam ich durch Pikrinsäure aus demselben noch immer einen starken Niederschlag, der sich beim Kochen nicht löste. Die Metaphosphorsäure selbst hingegen gibt mit der Pikrinsäure keinen Niederschlag. Beim Stehen enstand in dem Filtrat des Eiweißniederschlages auch von selbst ein Sediment.

5. Selbst Eiweiß wird im Überflusse der Metaphosphorsäure teilweise gelöst, was so konstatiert wurde, daß ich in einem Falle zu einer Lösung von Eiereiweiß eine solche Menge Metaphosphorsäure gab, die noch einen neuen Niederschlag hervorrief. Das Gewicht des so gewonnenen Niederschlags war

0,56 g.

In einem zweiten Falle benutzte ich zweimal so viel Metaphosphorsäure, worauf ich nur einen Niederschlag von

0,41 g

erhielt.

Ein interessantes Resultat hatten die mit dem Brückeschen Reagens vollbrachten Versuche. Aus den in der Literatur angegebenen Daten erhellt, daß der Leim durch das

Brückesche Reagens ausgefällt wird. Ich wollte bestimmen, wieviel Säure man zu dem Brückeschen Reagens wenigstens geben muß, damit dasselbe den Leim vollständig ausfälle.

Zu diesem Zwecke wurde gereinigte Gelatine angewendet; reine französische Gelatine wurde zuerst mit salzhaltigem Wasser, nachher mit destilliertem Wasser so lange gewaschen, bis sie chlorfrei wurde; dann wurde sie auf dem Wasserbade eingetrocknet und von der Trockensubstanz je nach Bedarf eine Lösung gemacht.

In den Versuchen gab ich zur Leimlösung 10 ccm Quecksilberjodid-Jodkalium und verschiedene Mengen Salzsäure. Als ich die Menge der gebundenen Säure auf eine später zu behandelnde Weise bestimmte, ergab sich, daß die Quantität der gebundenen Säure um so geringer war, je größer der Überschuß derselben war; zugleich war auch der gewonnene Niederschlag um so geringer.

Tabelle IV.

Versuch	Leim ccm	$^n/_{10}$-HCl ccm	Gebundene Säure ccm
1	10	10	1,28
2	10	20	1,23
1	10	5	1,17
2	10	10	1,10
3	10	20	0,97
4	10	50	0,42

Der Niederschlag ist also im Überschuß der Säure löslich; dasselbe beobachtete ich auch bezüglich der Salpetersäure und der Schwefelsäure, obwohl diesen gegenüber der Niederschlag weniger empfindlich ist. Durch Quecksilberjodid-Jodkalium allein, ohne Säure, wird weder der Leim noch das Eiweiß aus neutraler Lösung ausgefällt.

Eine weitere Frage war das Verhalten des Leimes der Pikrinsäure gegenüber. Die Pikrinsäure empfahl Klug als leimnachweisendes Reagens, da der durch dieselbe gewonnene Leimniederschlag durch Erhitzen lösbar ist. Dieses Verhalten schien zur qualitativen Bestimmung geeignet, weil ein großer Teil der durch Pikrinsäure gewinnbaren Eiweißniederschläge durch Erhitzen nicht löslich ist. Da ich aber keine

auf den quantitativen Verlauf der Reaktion bezügliche Daten fand, war erst notwendig zu entscheiden, ob der Leim durch die Pikrinsäure vollständig ausgefällt wird.

Der in den Versuchen benutzte Leim war auch in diesen Fällen reine französische Gelatine, die in einigen Fällen in der schon erwähnten Weise gereinigt wurde; ähnliche Versuche stellte ich auch mit Gelatine an, die dieser Prozedur nicht unterworfen wurde, es konnte aber kein Unterschied festgestellt werden. Die Pikrinsäure war eine kalt gesättigte wässerige Lösung, deren Pikrinsäuregehalt ich durch Titration, Trockensubstanzbestimmung und Stickstoffbestimmung kontrollierte. Der Leimniederschlag wurde in einer mit Deckel versehenen Schale hervorgerufen und in derselben gewaschen, weil wegen dessen zäher, festhaftender Eigenschaft eine quantitative Übertragung desselben auf das Filter unmöglich war. In jedem Falle wurden wenigstens zwei parallele Versuche gemacht.

Die Bestimmung des Stickstoffgehaltes der Pikrinsäure.

Die Bestimmung des Stickstoffgehaltes der Pikrinsäure und der pikrinsäurehaltigen Niederschläge war durch die Kjeldahlsche Methode direkt nicht ausführbar.

10 ccm Pikrinsäure wurden mit 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure und krystallisiertem Kupfersulfat gekocht und das entstandene Ammoniak bestimmt. Die gefundenen Werte von N waren nur

0,0130 g,
0,0125 g,
0,0131 g.

Die Pikrinsäure war etwas stärker als $^n/_{20}$, ihr Stickstoffgehalt also mehr als 0,0212 g. Bei einer anderen Pikrinsäurelösung, die beinahe genau $^n/_{20}$ war, erhielt ich in 10 ccm die in der folgenden Tabelle angeführten Werte.

Tabelle V.

Versuch	N g	Versuch	N g	Versuch	N g
1	0,0134	6	0,0126	11	0,0129
2	0,0136	7	0,0127	12	0,0133
3	0,0136	8	0,0123	13	0,0127
4	0,0133	9	0,0120	14	0,0134
5	0,0135	10	0,0130	15	0,0124

Nach verschieden langem Kochen haben die Werte keine charakteristische Veränderung gezeigt. Mit trocken abgewogener Pikrinsäure erhielt ich ähnliche Resultate; die folgenden Werte sind auf 1 g Pikrinsäure umgerechnet, dessen wirklicher Stickstoffgehalt 0,1748 g wäre.

Tabelle VI.

Versuch	N g	Versuch	N g
1	0,1103	5	0,1189
2	0,1143	6	0,1183
3	0,1124	7	0,1130
4	0,1174	8	0,1118

Die gefundenen Werte bilden also nur etwa den $^2/_3$ Teil des wirklichen Stickstoffgehaltes; der Grund ist das in dem Pikrinsäuremolekül enthaltene Nitroradikal, und ähnlich verhält sich jeder Körper, aus dem Piperidinderivate entstehen können[1] [2] [3]. Nun reduzierte ich in den folgenden Versuchen die Pikrinsäure. In der Chemie sind viele Methoden der Reduzierung bekannt, doch fand ich in der mir zur Verfügung stehenden Literatur keine Angaben, ob man je eine dieser Methoden bei der Bestimmung des Stickstoffgehaltes der Pikrinsäure benutzt hätte. Es ist bekannt, daß aus der Pikrinsäure durch Einwirkung von Schwefelammonium Amidodinitrophenol, durch Zinnchlorür oder HJ Triaminophenol entsteht[4]; sie ist außerdem durch Eisensulfat und Barytwasser, durch Zinkpulver und Chlorkaliumlösung reduzierbar.

Zuerst versuchte ich die Reduktion durch Metallzink und Salzsäure[5] [6], die nachherige Zerstörung beim Kjeldahlschen Verfahren ging aber schwer vonstatten, weil das ganze Gemisch zu einer braunen, schwammigen Masse eintrocknete; die Werte waren zwar bessere als die vorherigen, jedoch keine befriedigenden.

Tabelle VII.

Versuch	Abgewogene Pikrinsäure g	N g	Auf 1 g umgerechnet N g
1	0,6470	0,1184	0,1830
2	0,9537	0,1620	0,1699
3	0,5906	0,1047	0,1773
4	0,7844	0,1337	0,1705

---

[1]) Kutscher und Steudel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 39, 513, 1903.

[2]) Henderson, ibid. 39, 322, 1900.

[3]) Sörensen und Andersen, ibid. 44, 431.

[4]) Beilstein, l. c.

[5]) Gattermann, Die Praxis der organischen Chemie. Leipzig 1904.

[6]) B. v. Horváth, Über die Kondensation von Amidobenzylalkohol mit Phenolen. Inaug.-Diss. Karlsruhe 1903.

Endlich gelang es mir, eine Reduktionsweise zu finden, die allen Anforderungen entspricht. Dieselbe geschah mittels Eisenspänen und konzentrierter Essigsäure. Man gibt zu der im Kjeldahlschen Kolben sich befindenden Pikrinsäure $^1/_2$ bis 1 g Eisenspäne, 5 ccm Essigsäure, 20 ccm konzentrierte Schwefelsäure und etwas Kupfersulfat, das Gemisch wird dann ganz genau wie bei dem Kjeldahlschen Verfahren gekocht, nach dem Erkalten mit Wasser verdünnt, stark alkalisch gemacht und das Ammoniak abdestilliert. Die so gefundenen Werte sind auf 1 g umgerechnet:

0,1748 g N,
0,1746 g N,
0,1752 g N,
0,1759 g N.

Der Stickstoffgehalt von 1 g trocken abgewogener Pikrinsäure war also im Mittelwert 0,1751, theoretisch zu erwarten war 0,1748 g, die beiden Werte stimmen innerhalb der Grenzen der Versuchsfehler überein, ja, der maximale Unterschied zwischen den einzelnen Werten ist nicht größer als 0,6 $^0/_0$.

Zur Entscheidung, ob die Reduktion durch eiweißartige Substanzen nicht gestört wird, wurde eine Menge Pikrinsäure mit Leim gemischt und hierauf der Stickstoffgehalt des Gemisches, wie auch in gleichen Proben der einzelnen Komponenten in der geschilderten Weise bestimmt.

Die Pikrinsäure enthielt	0,0394 g,
der Leim	0,0171 g,
das Gemisch also	0,0565 g N.
Gefunden wurde	0,0566 g N.

In einem anderen Falle war der berechnete Wert

0,0566 g,

gefunden wurde 0,0566 g. Aus einem Eiereiweiß-Pikrinsäure-Gemisch bekam ich

0,0784 g N

anstatt

0,0783 g N.

Die Werte stimmen innerhalb der Versuchsgrenzen überein.

Unter welchen Umständen wird der Leim durch Pikrinsäure quantitativ ausgefällt?

Der Zweck der folgenden Versuchsreihe war, zu entscheiden, ob der Leim durch die Pikrinsäure tatsächlich quantitativ ausgefällt wird.

In den Versuchen gab ich zum Leim verschiedene Mengen Pikrinsäure, nach 24 Stunden goß ich die Flüssigkeit vom Niederschlag durch ein gewogenes Filter ab und wog nach dem Trocknen das Filter samt Glas mit eingeschliffenem Stöpsel, in welchem der Niederschlag hervorgerufen wurde.

Der Niederschlag wurde nicht gewaschen, weil er sich in Wasser ziemlich leicht, ja teilweise auch in Alkohol löst, wie dies aus folgenden Versuchen erhellt: ich fand ohne Nachwaschen im Niederschlage

0,1438 g Leim,

nach dem Waschen mit Alkohol aber nur

0,1298 g.

Den Leimgehalt des Niederschlages berechnete ich folgenderweise: das Gesamtgewicht war im ersten Falle 0,2009 g; hiervon zog ich 0,0571 g, das Gewicht der Trockensubstanz von 2,54 ccm im Niederschlage verbliebenen $^n/_{20}$-Pikrinsäure ab; diese Zahl gewann ich so, daß ich vorher die Acidität des Leimes und der hinzugegebenen Pikrinsäure gesondert bestimmte und von der Summe der beiden Werte die Acidität des Filtrates abzog. Die Titrierungen waren mit $^n/_{10}$-Natronlauge ausgeführt und darum sind alle Werte der Acidität in den Tabellen in $^n/_{10}$-Werten ausgedrückt; als Indicator wurde eine 1 %ige alkoholische Phenolphthaleinlösung gebraucht und die Titrierung bis zur ersten bleibenden rosaroten Spur fortgesetzt. Die Resultate der parallelen Versuche stimmten bis zu 1 % überein; die aus verschiedenen Gründen eintretende Verdünnung beeinflußte die Genauigkeit der Resultate nicht, wie dies die folgenden Angaben beweisen:

1. 10 ccm Pikrinsäurelösung band 4,76 ccm $^n/_{10}$-NaOH,
2. dieselbe zweifach verdünnt 4,76 „ „
3. dieselbe zehnfach verdünnt 4,79 „ „

Es ist zu bemerken, daß ich zu den Versuchen durch Luftdurchströmung von der Kohlensäure befreites, destilliertes Wasser benutzte; bei Anwendung von gewöhnlichem destillierten Wasser waren zur Neutralisierung derselben Pikrinsäuremenge bei zweifacher Verdünnung 4,78 ccm, bei zehnfacher Verdünnung 5,1 ccm Lauge nötig.

In den folgenden Versuchen verdünnte ich ein und dieselbe Stammlösung des Leimes in verschiedenen Massen, maß

20 ccm der so gewonnenen Lösungen ab und gab 10 ccm einer beiläufig $^{n}/_{20}$-Pikrinsäurelösung hinzu.

Tabelle VIII.

Versuch	Grad der Verdünnung	Leim	Trockensubstanz	Asche	Niederschlag	Gebundene $^{n}/_{10}$-Pikrinsäure		Leimgehalt des Niederschlages	Leimverlust	
		g	%	g	g	ccm	g	g	g	%
1	1	0,1802	0,90	0,0017	0,2180	2,31	0,0556	0,1624	0,0178	10
2	5	0,0394	0,20	0,0003	0,0490	0,64	0,0155	0,0335	0,0059	15
3	10	0,0202	0,10	0,0002	0,0252	0,41	0,0098	0,0154	0,0048	24
4	20	0,0097	0,05	—	0,0131	0,25	0,0060	0,0071	0,0026	27

Es ist folglich offenbar:

1. Der Leim wird durch die halbe Menge einer gesättigten Pikrinsäurelösung nicht vollständig ausgefällt.

2. Die Menge des gewonnenen Niederschlages hängt in großem Maße von der Konzentration der Leimlösung ab, und zwar in dem Sinne, daß ein um so größeres Prozent des Leimes ausgefällt wird, je konzentrierter die Leimlösung war, vorausgesetzt, daß die Konzentration der Pikrinsäure dieselbe ist.

In der folgenden Versuchsreihe (Tab. IX) gab ich zu Leimproben, deren Leimgehalt derselbe war, verschiedene Mengen Pikrinsäure; auf solche Weise erhöhte ich in erster Reihe die Konzentration der Pikrinsäure im Gemische, selbstverständlich wurde aber gleichzeitig die Konzentration des Leimes vermindert.

Aus dieser Tabelle folgt:

1. Trotzdem bei Anwendung einer größeren Menge Pikrinsäure die Konzentration des Leimes geringer ist, als bei Anwendung einer kleineren Pikrinsäuremenge, dominiert die Wirkung der Pikrinsäurekonzentration dermaßen, daß bei Anwendung einer größeren Pikrinsäurequantität mehr Leim ausgefällt wird.

2. Bei Anwendung weniger Pikrinsäure bleibt ein beträchtlicher Teil des Leimes in Lösung, obwohl diese Pikrinsäuremenge schon größer ist, als jene, die die unter den günstigsten Verhältnissen ausgefällte Leimquantität in sich zurückbehält. Bei Anwendung einer größeren Menge Pikrinsäure nimmt die

Quantität des ausgefällten Leimes im Anfange rapid, später nur sehr langsam zu.

Tabelle IX.

Versuch	Abgewogener Leim			n/20-Pikrinsäure	Im Niederschlage			Leimverlust		Gesamtgewicht des Niederschlages
					Pikrinsäure		Leim			
	ccm	g	%	ccm	ccm	g	g	mg	%	g
1	10	0,0957	0,9	5	1,37	0,0307	0,0718	23,9	25	0,1025
2	10	0,0957	0,9	10	1,38	0,0310	0,0779	18,6	19	0,1089
3	10	0,0957	0,9	20	1,51	0,0339	0,0764	20,2	20	0,1103
4	10	0,0957	0,9	30	1,98	0,0445	0,0777	18,6	19	0,1222
5	10	0,0957	0,9	40	1,58	0,0355	0,0825	13,8	14	0,1180
6	10	0,0957	0,9	50	1,57	0,0352	0,0816	14,7	15	0,1168
7	10	0,0957	0,9	100	1,53	0,0344	0,0801	16,3	16	0,1445
1	10	0,1368	1,3	2	0,21	0,0047	0,0140	122,8	85,8	0,0187
2	10	0,1368	1,3	3	0,68	0,0153	0,0489	87,9	62,8	0,0642
3	10	0,1368	1,3	4	1,15	0,0258	0,0806	56,2	40,1	0,1064
4	10	0,1368	1,3	5	1,64	0,0369	0,1156	21,2	15,1	0,1525
5	10	0,1368	1,3	10	1,81	0,0407	0,1197	15,1	10,8	0,1604
6	10	0,1368	1,3	20	2,18	0,0490	0,1249	11,9	8,5	0,1739
7	10	0,1368	1,3	30	2,50	0,0562	0,1280	8,8	6,4	0,1842
8	10	0,1368	1,3	40	2,30	0,0517	0,1326	4,2	3,1	0,1843
9	10	0,1368	1,3	50	2,36	0,0531	0,1317	5,1	3,6	0,1848

3. Auch durch eine große Quantität Pikrinsäure wird der Leim nicht vollständig ausgefällt. In dünnen Leimlösungen bleiben selbst bei Anwendung eines zehnfachen Überschusses mehr als 16% in Lösung, in konzentrierten Lösungen bei fünffachem Überschuß noch immer etwa 3%.

Mit Rücksicht darauf, daß das Arbeiten mit einer großen Flüssigkeitsmenge sehr umständlich ist, versuchte ich eine größere Konzentration der Pikrinsäure auf solche Art zu erreichen, daß ich das Leim- und Pikrinsäuregemisch auf dem Wasserbade zur Hälfte eindampfte. In anderen Fällen gab ich ein entsprechendes Quantum Pikrinsäure in fester Form zur Leimlösuug, so, daß die Lösung mit Pikrinsäure gesättigt sei, doch waren die Resultate noch schlechter als die vorherigen. Im ersten Falle waren beim Ausfällen mit Pikrinsäurelösung

0,0819 g

Leim im Niederschlage, nach dem Eindämpfen zur Hälfte dagegen nur

0,0610 g.

Im zweiten Falle war der Leimverlust beim Ausfällen mit der Lösung 10%, beim Anwenden der festen Pikrinsäure aber 20%.

Mit Rücksicht auf die in den vorherigen Versuchen beobachteten unregelmäßigen Schwankungen schien es wahrscheinlich, daß auch hier die Temperaturschwankungen eine Rolle spielen könnten. Deshalb fällte ich den Leim durch Pikrinsäure in den folgenden Versuchen aus kalter Lösung.

Tabelle 10.

Versuch	Leim		Pikrinsäure	Leim im Niederschlag	Bilanz	Grad der Abkühlung
	ccm	g	ccm	g	%	°C
1	15	0,1280	15	0,1247	− 2,6	12
2	15	0,1280	15	0,1297	+ 1,3	8

Demgemäß **wird also der Leim durch dasselbe Quantum gesättigter Pikrinsäure bei einer Temperatur von 8° schon quantitativ ausgefällt.** Die bemerkbare geringe positive Abweichung ist auf Kosten der mit der Titrierung verknüpften Fehler zu schreiben. Bei Zimmertemperatur wurden aus einer gleich konzentrierten Leimlösung unter sonst ähnlichen Verhältnissen nur 80% ausgefällt. Die Temperatur spielt also beim Ausfällen des Leimes eine wichtige Rolle, und zwar in entgegengesetzter Richtung wie beim Eiweiß.

Auf Grund dieser Versuche schien die Pikrinsäure zur Bestimmung des Leimes geeignet. Da jedoch die Pikrinsäure im Niederschlag immer in erheblicher Menge zurückblieb, mußte ein Verfahren gesucht werden, mittels dessen auch dieses Pikrinsäurequantum in Rechnung gezogen werden konnte.

Die Bestimmung des Säurebindungsvermögens des Leimes.

Trotz der entgegengesetzten Deutung einiger Untersuchungen[1][2]) kann als feststehend betrachtet werden, daß das Eiweiß sich mit Säuren in einem bestimmten Verhältnis vereinigen und mit denselben eine salzartige Verbindung bilden kann[3]. Da der Leim in vielen Beziehungen ein den wirklichen Eiweißkörpern ähnliches Verhalten zeigt, war es wahr-

[1]) Danilewsky, Centralbl. f. med. Wiss. 51, 1880.

[2]) Ambard und Foa, Compt. rend. Soc. Biol. 59, H. 2—4, 7—9.

[3]) Rhorer, Arch. f. d. ges. Physiol. 90, 368.

scheinlich, daß er sich beim Ausfällen mit der Pikrinsäure gleichfalls in bestimmten Gewichtsverhältnissen vereinigt; dies würde die in jedem Falle separate Bestimmung des Pikrinsäuregehaltes der Leimniederschläge vermeidbar und folglich die Leimbestimmung einfacher machen.

Zur Bestimmung des Säurebindungsvermögens eiweißartiger Substanzen ist die Messung der elektrischen Leitfähigkeit[1]) und der elektromotorischen Kraft, Gefrierpunktsbestimmung[2]), Titrierung mit Tropäolin[3]), oder mit Hilfe des Güntzburgschen Reagens[4]), Aussalzen durch Ammonsulfat[4])[5]) und endlich die mit Ausfällen kombinierte Titrierung angewendet worden.

Von diesen Methoden ist bei so schwachen Basen, wie die Eiweißkörper, die einfache Titrierung unter gewöhnlichen Verhältnissen nicht anwendbar[6]); die Reaktion läuft nämlich infolge der Hydrolyse in einer Richtung nicht vollkommen ab, sondern es stellt sich ein reversibler Gleichgewichtszustand ein, bei welchem die Gesetze der Massenwirkung maßgebend sind; auch die elektrische Methode zeigt nicht die Menge der freien Säure, sondern die Summe des Säureüberschusses und der hydrolysierten Säure. Hingegen scheint bei Anwendung von Salzsäure die Titrierung mit dem Güntzburgschen Reagens verläßlich zu sein, weil dasselbe nur auf die freie Säure reagiert, so daß die Werte mit den aus der Inversionsgeschwindigkeit gewonnenen gleich sind. Gleich gute Resultate gibt das mit dem Ausfällen kombinierte Titrierungsverfahren, mittels dessen Rhorer mit den in der vorherigen Weise gewonnenen Werten übereinstimmend 1 g krystallisiertes Eiweiß mit 37,2 mg HCl äquivalent fand.

Da der pikrinsaure Leim sich in Wasser sehr leicht löst, konnte ich das unmittelbare Titrierungsverfahren hier auch nicht anwenden. Ich brachte also folgendes bei den Eiweißsubstanzen durch Rhorer[6]) gebrauchtes Verfahren in Anwendung

---

[1]) Sjöquist, Skand. Arch. f. Physiol. 5, 277, 1894.

[2]) Liebermann und Bugarszky, Arch. f. d. ges. Physiol. 72, 51, 1898.

[3]) Danilewsky, l. c.

[4]) O. Cohnheim, Zeitschr. f. Biol. 15, 489, 1896.

[5]) Spiro und Pemzel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 233, 1898.

[6]) Rhorer, l. c.

Zur Leimlösung gab ich eine bekannte Menge Salzsäure, dann wurde der Leim durch Quecksilberjodid-Jodkalium ausgefällt, auf einem gewogenen Filter gewaschen (teilweise in dem Gefäß, in welchem der Niederschlag hervorgerufen wurde), das Filtrat mit der Waschflüssigkeit zusammen titriert. Aus den gewonnenen Werten rechnete ich auf die schon früher behandelte Weise die im Niederschlag zurückgebliebene Säure aus. Der Leim war in der schon gleichfalls angegebenen Weise gereinigte Gelatine, zu einem Liter der Quecksilberoxyd-Jodkaliumlösung nahm ich $^{1}/_{20}$ Mol HgJ_2, gelöst in 3 äquivalenten JK. Zur Titrierung wurde $^{n}/_{10}$-NaOH angewendet, als Indicator diente Phenolphthalein.

Tabelle XI.

Versuch	Leim			HCl		Brücke		Gesamt-Acidität	Acidität des Filtrates	Gebundene Säure
		Trockensubstanz								
	ccm	g	Acidität	ccm	Acidität	ccm	Acidität			ccm
1	10	0,1368	0,30	10	11,13	10	0	10,43	9,15	1,28
2	10	0,1368	0,30	20	20,26	10	0	20,86	19,33	1,23
1	10	0,1159	0,24	5	4,90	10	0	5,14	3,97	1,17
2	10	0,1159	0,24	10	10,03	10	0	10,27	9,17	1,10
3	10	0,1159	0,24	20	20,20	10	0	20,44	19,47	0,97
4	10	0,1159	0,24	50	50,18	10	0	50,42	50,00	0,42

In meinen Versuchen war also die Menge der gebundenen Säure nicht konstant; je größer der Überschuß der Säure war, um so geringer war das im Niederschlage zurückgehaltene Quantum derselben; den Grund davon fand ich in dem Umstande, daß der Niederschlag im Überschusse der Salzsäure löslich ist. Um einwandfreie Resultate zu erzielen, kann man also bei der Untersuchung des Säurebindungsvermögens des Leimes bei dieser Methode die Salzsäure nicht anwenden.

In den folgenden Versuchen gab ich Pikrinsäure zum Quecksilberjodid-Jodkalium. Pikrinsäure ist in dieser Form zur Untersuchung des Säurebindungsvermögens meines Wissens nach noch nicht angewendet worden. Durch dieses Gemisch ist der Leim vollständig ausfällbar, wie ich mich durch Kontroll-Stickstoffbestimmungen überzeugt habe, und der Niederschlag ist weder im Überschusse der Reagenzien noch im Wasser löslich.

Demgemäß bindet der Leim beim Titrieren immer ein gewisses Quantum Lauge und erscheint darum Phenolphthalein gegenüber sauer. Beim Ausfällen mittels Quecksilberjodid-

Jodkalium nimmt er, ähnlich wie die Eiweißstoffe, eine bestimmte Menge Säure mit sich. Das Quantum der gebundenen Säure ist vom angewandten Säureüberschusse unabhängig, weil im 1. und 2. Versuche die gebundene Säure innerhalb der Versuchsfehlergrenzen gerade so viel war, wie im 5. und 6. Versuche, trotzdem im 1. und 2. Falle die Säure kaum etwas mehr war, als die äquivalente Säuremenge, im 5. und 6. Falle hingegen war dieselbe in 10fachem Überschusse.

Tabelle XII.

Versuch	Leim			Pikrinsäure		Brücke	Gesamt-Acidität	Acidität des Filtrates	Gebundene Säure	
	ccm	Trockens.	Acidität	ccm	Acidität				ccm	auf 1 g
1	10	0,0860	0,24	2	0,95	10	0,19	0,19	1,00	11,6
2	10	0,0860	0,24	2	0,95	10	0,19	0,21	0,98	11,4
3	10	0,0860	0,24	5	2,26	10	2,50	1,54	0,96	11,2
4	10	0,0860	0,24	5	2,26	10	2,50	1,55	0,95	11,0
5	10	0,0860	0,24	10	4,65	10	4,89	3,94	0,95	11,0
6	10	0,0860	0,24	10	4,65	10	4,89	3,95	0,94	11,0

Im 1., 3., 5. Versuche wusch ich den Niederschlag mit destilliertem Wasser, im 2., 4., 6. mit Alkohol; die Werte sind innerhalb der Grenzen der Versuchsfehler übereinstimmend.

Die gebundene, folglich dem Leim äquivalente Säure entspricht auf 1 g Leimtrockensubstanz berechnet, im Mittel 11,3 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Mit Salzsäure bekam ich bei Anwendung des geringsten Säureüberschusses einen Wert von 10,1 ccm. Da jedoch der angewandte Säureüberschuß schon in diesem Falle beinahe das 5fache war und weil sich der Niederschlag im Überschusse der Salzsäure löst, war dieser Wert offenbar geringer als der äquivalente.

Bei den durch Pikrinsäure gewonnenen Werten ist die maximale Abweichung von dem berechneten Mittelwerte bloß 0,3 ccm, das ist 3 $^{0}/_{0}$; bis hierher erstreckt sich also die Möglichkeit des maximalen Fehlers, der wahrscheinliche Fehler bleibt natürlich um vieles unter diesem Werte.

Wenn man den Wert auf Salzsäure umrechnet, so ist 1 g Leim mit 41,1 mg Salzsäure äquivalent. 1 g krystallisiertes Eiweiß bindet nach Rohrer 37,2 mg Salzsäure.

Guttenberg[1]) bestimmte das Säurebindungsvermögen mit Hilfe des Güntzburgschen Reagens; gemäß seiner Untersuchungen fällt auf je 10 Atome Stickstoff 1 Mol HCl. Meinen obigen, mit Pikrinsäure gewonnenen Werten gemäß entsprechen je 10 Atome Leimstickstoff 37,1 g HCl. Dies stimmt innerhalb 2 $^0/_0$ mit dem Molekulargewichte der Salzsäure (36,38) überein. Vorausgesetzt, daß sich 1 Mol Leim mit 1 Mol Säure verbindet, ergibt sich laut obigen Erörterungen als das Molekulargewicht des Leimes 823. Paal[2]) fand 900.

Die quantitative Trennung des Leimes von den Eiweißsubstanzen.

Da der Leim, wie schon erwähnt, durch die Pikrinsäure quantitativ ausgefällt wird und im Niederschlage der Leim und die Pikrinsäure unter entsprechenden Umständen in bestimmtem Verhältnisse enthalten sind, schien die Pikrinsäure zur quantitativen Bestimmung des Leimes geeignet.

Jene Eigenschaft des Pikrinsäure-Leimniederschlages, daß sich derselbe, im Gegensatze zu den ähnlichen Niederschlägen der Eiweißsubstanzen, beim Erwärmen löst, benutzte Klug[3]) zur qualitativen Reaktion des Leimes. In meinen einschlägigen Versuchen fand ich hingegen:

1. Daß die nicht frischen, also durch Stehen oder durch einfaches Zentrifugieren zu Boden gesetzten Leimniederschläge sich nicht nur durch Erwärmen, sondern auch durch Kochen nur schwer und auch nicht immer vollständig lösen.

2. Die Albumosen und Peptone verhielten sich, insofern die mir zur Verfügung stehenden Präparate die Untersuchung gestatteten, in ähnlicher Weise.

Die Pikrinsäure ist also in der von Klug empfohlenen Weise zur quantitativen Trennung der Eiweißsubstanzen vom Leime nicht brauchbar, weil der durch dieselbe gewonnene Eiweiß-Leimniederschlag in frischem Zustande derart fein verteilt ist, daß man ihn überhaupt nicht filtrieren kann; nachdem sich aber der Leim zu Boden gesetzt, löst sich derselbe

---

[1]) Guttenberg, Münchner med. Wochenschr. 1896, 147.

[2]) Ergebnisse der Physiologie. Wiesbaden 1902.

[3]) Klug, l. c.

beim Erwärmen schlecht und so ist dessen Entfernung aus dem Niederschlage, also die Trennung von den Eiweißsubstanzen, nicht möglich.

In weiteren Versuchen beobachtete ich, daß der frische pikrinsaure Leim in Alkohol gut löslich ist; ein zu Boden gesetzter oder zentrifugierter Niederschlag löst sich im absoluten Alkohol allein selbst beim Kochen sehr schlecht, in Anwesenheit von Wasser besser, in Anwesenheit von Pikrinsäure schon bei geringer Erhitzung sehr gut, aber nur dann, wenn wir zuerst den Alkohol und dann die Pikrinsäure zum Niederschlag geben. Wenn wir die Reihenfolge umkehren, so ist die Löslichkeit selbst beim Kochen eine schlechte.

Zentrifugierter pikrinsaurer Leimniederschlag wird in Pikrinsäure, der das halbe Quantum Alkohol beigemengt ist, schon bei 40° vollständig gelöst, nach Vertreibung des Alkohols wird er wieder ausgefällt. Auf solche Weise bekam ich aus 15 ccm Leimlösung, dessen Trockengewicht

0,1280 g

war, einen Niederschlag im Gewichte von 0,1727 g; der Leimgehalt desselben war gemäß den Daten der Titrierung

0,1293 g,

der Versuchsfehler war also beiläufig 1%. Der Leim ist also aus einer Lösung durch Pikrinsäure vollständig ausfällbar, er löst sich bei 40° in alkoholische Pikrinsäure und ist aus der Flüssigkeit durch Vertreibung des Alkohols und starke Abkühlung wieder quantitativ ausfällbar.

Der Leim ist aus seiner alkoholisch-pikrinsaurer Lösung auch durch Gerbsäure ausfällbar, der Niederschlag löst sich jedoch im Überschusse des Alkohols; hingegen löst sich der durch Phosphorwolframsäure gewinnbare Niederschlag im Überschusse des Alkohols zwar nicht, doch bildet dieses Reagens mit der Pikrinsäure selbst einen Niederschlag.

Die weiteren Untersuchungen führten zu dem Ergebnisse, daß die vorher erwähnten Erfahrungen zur quantitativen Bestimmung des Leimes nur auf gewissen Umwegen anwendbar sind. Die Extraktion und Waschung eines Eiweiß-Leimniederschlages ist nämlich mit warmer alkoholischer Pikrinsäure auszuführen; jedoch beeinflußt die hierzu nötige langanhaltende Erwärmung die Reaktion in solcher Weise, daß der Leim selbst nach der vollständigen Vertreibung des Alkohols weder

durch Pikrinsäure, noch durch Quecksilberjodid-Jodkalium, noch durch Aussalzen vollständig ausgefällt werden kann.

Zur Bestimmung des Leimes sollte man also in Anwesenheit von Eiweiß zwei Bestimmungen machen; in der ersten fällt man das Eiweiß und den Leim mittels Pikrinsäure, entfernt die überflüssige Pikrinsäure durch Waschen mit Quecksilberjodid-Jodkalilösung und bestimmt den Stickstoffgehalt des Niederschlages. In dem zweiten Versuche wird die Flüssigkeit gleichfalls mit Pikrinsäure behandelt, dann aber der Leim durch Erwärmen mit alkoholhaltiger Pikrinsäure aus dem Niederschlage extrahiert. Die Differenz des Stickstoffgehaltes der beiden Niederschläge gibt den Stickstoffgehalt des Leimpikrates. Da je 10 Leim-N 1 Mol Pikrinsäure binden, sind in je 13 Atomen N 10 Leimnitrogenatome enthalten.

Bei der Anwendung dieser Methode für Urinuntersuchungen stellte es sich heraus, daß obwohl der pikrinsaure Leim in konzentrierter Kochsalzlösung, sowie in 2%iger Harnstofflösung nur schlecht löslich ist, in Kochsalz enthaltender Harnstofflösung löst er sich auch kalt verhältnismäßig gut, ebenso auch im Urin; bloß bei Anwendung eines großen Überschusses der Pikrinsäure bleibt ein Teil des Niederschlages ungelöst.

Demzufolge ist also die Pikrinsäure als qualitatives Leimreagens im Urin nur mit einer gewissen Vorsicht zu gebrauchen, namentlich ist sie immer in großem Überschusse anzuwenden, zur quantitativen Leimbestimmung im Urin ist sie aber allein gar nicht zu gebrauchen.

Zu interessantem Resultate führte eine Versuchsreihe, in der ich Alkohol und Pikrinsäure, in verschiedenen Verhältnissen vermengt, zur Leimlösung gab.

Tabelle XIII.

Versuch	Pikrinsäure	Alkohol	Niederschlag
1	1	0	sehr viel
2	1	1	" "
3	1	2	" "
4	1	3	etwas weniger
5	1	$3^1/_2$	kein Niederschlag
6	1	4	" "
7	1	5	" "
8	1	6	" "
9	1	7	" "
10	1	8	" "
11	1	9	" "
12	1	10	" "
13	1	20	wenig
14	1	100	viel
15	0	∞	"

Durch Pikrinsäure wird also ein beträchtlicher Teil des Leimes, unter entsprechenden Umständen dessen ganze Menge, ausgefällt; Alkohol fällt den Leim gleichfalls aus; im Gemisch der beiden Reagenzien ist der Niederschlag sehr leicht löslich und bei Anwendung eines bestimmten Verhältnisses der beiden wird gar kein Niederschlag mehr hervorgerufen. Die leimfällende Tätigkeit hört mit einer beinahe überraschend scharfen Grenze auf; im Falle des Verhältnisses 1:3 wird noch der größte Teil des Leimes ausgefällt, im Falle von $1:3^1/_2$ hingegen ist ein Niederschlag überhaupt nicht mehr bemerkbar. Von hier an kann man das Verhältnis der beiden Reagenzien bis auf 1:10 erweitern, ohne daß ein Niederschlag eintreten würde. Diese Erscheinung ist von der relativen Menge des Leimes vollständig unabhängig; so kann man z. B. mit einer im Verhältnis von 1:4 verfertigten alkoholischen Pikrinsäure den Leim in verschiedenstem Quantum vermischen, ohne einen Niederschlag zu bekommen. Durch Erhöhung der Pikrinsäurekonzentration auf 1:1 kann der größte Teil des Leimes wieder ausgefällt werden.

Aus weiteren Versuchen erhellte, daß durch dasselbe Gemisch (1:4) die übrigen eiweißartigen Stoffe, namentlich Albumine, Globuline, Albumosen, Peptone, Casein, Mucin und Ovomucoide ausgefällt werden.

Ohne den Grund dieser interessanten Erscheinung zu erforschen, versuchte ich dessen Anwendung zur quantitativen Bestimmung. Zuerst mußte ich bestimmen, ob der Leim aus der alkoholischen Pikrinsäure durch den Überschuß der Pikrinsäure quantitativ ausgefällt wird.

Tabelle XIV.

Versuch	Leim ccm	Alkoholische Pikrinsäure ccm	N mg
1	20	—	23,38
2	20	40	22,49

In dem vorstehenden Versuche gab ich zur Leimlösung die doppelte Menge alkoholischer Pikrinsäure (1 Teil gesättigte Pikrinsäurelösung + 4 Teile Alkohol 96%); es entstand kein Niederschlag; jetzt fällte ich den Leim durch Pikrinsäure, deren Menge mit jener des Gemisches gleich war, und ließ das Gemisch 12 Stunden bei 10° stehen, fing den Nieder-

schlag auf einem aschefreien Filter auf, wusch ihn mit Quecksilberjodid-Jodkaliumlösung so lange, bis die Flüssigkeit gelb gefärbt war, dann wurde der Stickstoffgehalt des Niederschlages bestimmt.

Es war also ein Niederschlag gewonnen, dessen N-Gehalt um $3^0/_0$ geringer war, als der des angewandten Leimes.

In den folgenden Versuchen stellte ich die Ausfällung mit doppelt so viel Pikrinsäure an.

Tabelle XV.

Versuch	Leim ccm	Alkoholische Pikrinsäure ccm	N mg
1	40	—	42,36
2	40	80	42,33

Aus einer Lösung des Leimes, die 42,36 mg N enthielt, wurde also ein Niederschlag gewonnen, dessen Stickstoffgehalt 42,33 mg, also jenem des Leimes gleich war.

In den weiteren Versuchen vermengte ich die Leimlösung mit eiweißhaltigen Substanzen, namentlich mit Milch und Eiereiweiß. Die Eiweißstoffe wurden dann durch die doppelte Menge alkoholischer Pikrinsäure ausgefällt, aus dem Niederschlage der Leim mit alkoholischer Pikrinsäure extrahiert und aus dem Filtrat durch anderthalbfache Pikrinsäure bei 10° ausgefällt.

Tabelle XVI.

Versuch	Leim ccm	Eiweißhaltige Substanz	N mg
1	40	—	68,38
2	40	60 ccm Milch	68,34
1	20	—	20,68
2	20	40 ccm Eiereiweiß	20,35

Aus der Milch bekam ich also einen Niederschlag, dessen Stickstoffgehalt jenem des abgewogenen Leimes vollkommen gleich war, aus dem Eiereiweiß hingegen um $1{,}5^0/_0$ weniger. In den folgenden Versuchen benutzte ich ebenfalls Eiereiweiß. Da ich inzwischen fand, daß die Pikrinsäure, über eine alkoholisch-pikrinsaure Leimlösung geschichtet, noch selbst in einer Verdünnung von 1:100000 einen gut wahrnehm-

baren weißgelben Ring bildet, wurde der Eiweißniederschlag so lange gewaschen, bis die Reaktion nicht mehr positiv war.

Tabelle XVII.

Versuch	Leim ccm	Eiweißhaltige Substanz	N mg
1	20	—	20,68
2	20	40 ccm Eiereiweiß	20,65

Aus diesen Versuchen erhellt also, daß der Leim von den Albuminen, Globulinen, Paranucleoproteiden des Eies, von den Mucoiden und wahrscheinlich auch von den Albumosen und Peptonen mit Hilfe der alkoholischen Pikrinsäure durch ein verhältnismäßig einfaches Verfahren trennbar und dessen Menge quantitativ bestimmbar ist.

Weitere Versuche müssen entscheiden. inwiefern diese Methode im Blut und Urin anwendbar ist.

Zusammenfassung.

Von gereinigter Gelatine sind in Wasser bei 21° 0,62°/₀, bei 18° 0,60°/₀ und bei 17° 0,56°/₀ löslich; die Menge des in kaltem Wasser löslichen Leimes ist also annähernd gleich der kleinsten Leimmenge, die zur Geleebildung nötig ist. Wenn kaltgesättigte Leimlösung mit Leimstücken in Berührung bleibt, scheidet sich bei Erniedrigung der Temperatur ein Teil des Leimes aus, es bildet sich also kein Gelee.

Leim wird durch Alkohol nicht quantitativ ausgefällt. Durch Metaphosphorsäure werden weder Leim noch Eiweiß vollkommen ausgefällt; in einem Überschusse der Metaphosphorsäure löst sich der Eiweißniederschlag teilweise, der Leim vollkommen.

Die quantitative Bestimmung des N in Pikrinsäure und pikrinsäurehaltigen Niederschlägen ist mit dem direkten Kjeldahlschen Verfahren nicht ausführbar; die so gewonnenen Zahlen sind nur $^2/_3$ Teil des richtigen Wertes. Nach vorheriger Reduktion mittels Eisenspänen und Essigsäure ist die Methode anwendbar. Anwesenheit von Eiweißkörpern stört die Bestimmung nicht.

Leim wird bei Zimmertemperatur durch Pikrinsäure nicht quantitativ ausgefällt. Selbst bei konzentrierter (1,4%iger) Leimlösung und fünffacher Pikrinsäuremenge ist der Leimverlust annähernd 4%. Ist die Leimlösung weniger konzentriert oder der Säureüberschuß ein geringer, so ist der Unterschied noch größer. Bei einer Temperatur von 8° wird dagegen Leim schon durch das gleiche Volumen einer gesättigten Pikrinsäurelösung quantitativ ausgefällt.

Das Säurebindungsvermögen des Leimes ist durch die Fällungsmethode mittels Quecksilberjodid-Jodkalium und Salzsäure nicht bestimmbar, da der Niederschlag sich bei Säureüberschuß löst. Mittels Pikrinsäure und Quecksilberjodid-Jodkalium konnte festgestellt werden, daß der Leim, ähnlich wie das Eiweiß, bei der Fällung sich mit der Säure immer in einem konstanten Verhältnisse vereinigt. In guter Übereinstimmung mit Guttenberg, der zu diesem Zwecke die Güntzburgsche Reaktion benutzte, fand ich, daß jedes Gramm Leim sich mit 11,3 ccm $^{n}/_{10}$-Säure verbindet, also jedes Mol Säure mit einer Leimmenge äquivalent ist, die 10 Stickstoffatome enthält. Die gebundene Säuremenge ist unabhängig von dem Säureüberschusse. Das Molekulargewicht des Leimes kann auf 823 gesetzt werden.

Ein durch Pikrinsäure hervorgerufener Leimniederschlag löst sich in Gegenwart von Alkohol bei der Erwärmung viel leichter als in Pikrinsäure allein, löst sich auch in kochsalzhaltiger, 2%iger Harnstofflösung. Pikrinsäure allein ist also für Leimbestimmungen im Harn nicht anwendbar.

In einem bestimmten Verhältnis bereitete alkoholhaltige Pikrinsäurelösung (1 Teil gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung + 4 Teile Alkohol) fällt Eiweißstoffe, Albumosen, Peptone, Mucin und Casein, aber keinen Leim[1]); in der so gewonnenen Alkohol-Pikrinsäure-Leimlösung ist der Leim durch überschüssige Pikrinsäure in der Kälte ausfällbar. Mit diesem Verfahren wurden aus Gemischen von Milch und Eiereiweiß mit Leim Niederschläge gewonnen, deren N-Gehalt mit dem N-Gehalt des Leimes bis 1% übereinstimmte.

---

[1]) Nach Abschluß der Versuche fand ich, daß eine alkoholische Pikrinsäurelösung in geeigneter Konzentration von gleicher Wirkung ist.

Dieses Verfahren ist auch als qualitative Leimreaktion, selbst in Gemischen von Leim mit Eiweißkörpern, anwendbar. Durch alkoholische Pikrinsäure kann man letztere entfernen und das Filtrat mit gesättigter Pikrinsäurelösung behandeln. In Anwesenheit von Leim kommt dann selbst in einer Verdünnung von 1 : 100000 eine weißgelbe Trübung zustande. Am besten gelingt die Reaktion als Ringprobe. Der entstandene Leimniederschlag ist in Überschuß von Alkohol wieder löslich, sowie auch beim Erhitzen auf 40°. Diese qualitative Reaktion ist selbst im Harn anwendbar, nur braucht man bei der Fällung des Leimes einen größeren Überschuß an Pikrinsäure.

Ich führte diese Versuche im Physiologischen Institut der Königl. ung. tierärztlichen Hochschule zu Budapest unter der Leitung des Herrn Prof. Dr. Géza Farkas aus, dem ich für seine wertvollen Ratschläge und für seine Unterstützung auch auf diesem Wege meinen besten Dank ausspreche.

Untersuchungen über Purinstoffwechsel.

X. Mitteilung.

Über die Eigenschaft des Organismus, Harnsäure zu zerstören und solche durch Oxydation zu bilden bei Tieren mit synthetischer Harnsäureproduktion.

Von

Vittorio Scaffidi.

(Aus dem Laboratorium des italienischen Hospitals zu Buenos Aires.)

(Eingegangen am 10. August 1912.)

Über das Vermögen des Vogelkörpers, auf synthetischem Wege aus den Übergangs- und Endprodukten des N-Stoffwechsels Harnsäure aufzubauen, liegen verschiedene Arbeiten vor.

So von v. Knieriem[1]), der mitteilt, daß beim Huhne das Asparagin, die Asparaginsäure, das Glykokoll, das Leucin quantitativ in Harnsäure umgewandelt werden. Meyer[2]) gibt an, daß Harnstoff vom Organismus dieses Tieres zum größten Teile in Harnsäure umgebildet wurde. v. Schröder[3]) hebt gegen v. Knieriem hervor, daß der Hühnerorganismus 77 bis 88% der aufgenommenen Ammonsalze in Harnsäure umsetze.

Nach Wiener[4]) würde die synthetische Bildung der Harnsäure zustande kommen, indem ein Molekül Harnstoff sich mit einem Molekül einer zweibasischen Säure der 3-C-Kette (Malonsäure, Tartronsäure, Mesoxalsäure) verbände.

So würde erst ein Molekül Dialursäure entstehen und dann durch die Einwirkung eines weitern Moleküls Harnstoff, die Harnsäure sich bilden. Dieselbe Synthese würde auch vom Glycerin ausgehend eintreten, und Minkowski[5]) hat indirekte Beweise dafür erbracht, daß sie auch von der Milchsäure aus statthabe.

---

[1]) v. Knieriem, Zeitschr. f. Biol. 13, 1877.

[2]) Meyer, Beiträge z. Kenntnis des Stoffwechsels der Hühner. 1877.

[3]) v. Schröder, Zeitschr. f. physiol. Chem. 2, 1878.

[4]) H. Wiener, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 1902.

[5]) Minkowski, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 31, 1893.

Kowalewski und Salaskin[1]) haben, von den Versuchen Minkowskis ausgehend, gefunden, daß bei Durchströmung der überlebenden Gänseleber mit milchsaurem Ammon sich Harnsäure bildet.

Bei den Vögeln stellt die Harnsäure bekanntlich dasselbe vor, was der Harnstoff im N-Stoffwechsel der Säuger; es ist jedoch noch nicht festgestellt, ob und in welchem Maße der Organismus der erstgenannten Tiere imstande ist, Harnsäure zu zerstören und diese Säure durch Oxydation zu bilden. Die diesbezüglichen Versuche von Mach[2]) zeigen, daß beim Huhn und bei der Gans sich Harnsäure aus dem Hypoxanthin bilden kann, daß bei den genannten Tieren aber eine weitere Spaltung der Purinkörper im Organismus nicht stattfindet.

Meine vorliegenden Versuche sind an Enten vorgenommen worden und betreffen:

1. die Zerstörung der Harnsäure im Körper;
2. die Bildung von Harnsäure auf oxydativem Wege aus den Basen der Nucleinsäure;
3. aus einer derjenigen Basen, an denen diese Säure am reichsten ist.

Zu diesen Zwecken sind 3 Versuchsserien durchgeführt worden, d. h.

1. mit Harnsäure,
2. mit Nucleinsäure.
3. mit Guanin.

Alle Versuchsenten sind vor Einleitung der Versuche eine gewisse Zeitlang bei ganz genau dosierter Maisration gehalten worden (Vorversuch): Auf diese Weise werden die Schwankungen im Stoffwechsel der Tiere auf belanglose Unterschiede herabgesetzt, und man kann demnach die durch die Versuche bedingten Veränderungen genau werten.

Die Exkremente (Faeces und Urin zusammen) sind wie bei meinen früheren Versuchen[3]) gesammelt und untersucht worden. Die Analysen sind am Material von jeweils 2 Tagen ausgeführt worden.

Auf diese Weise werden die an sich schon belanglosen eventuellen Tagesschwankungen noch weiter ausgeglichen und es ist möglich, die eventuellen Veränderungen am Tage nach dem Versuche schon genau zu kontrollieren. Fast alle Analysen sind doppelt ausgeführt worden.

---

[1]) Kowalewski und Salaskin, Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**, 1901.

[2]) V. Mach, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **24**, 1888. — Brugsch und Schittenhelm, Der Nucleinstoffwechsel. Jena 1910.

[3]) V. Scaffidi, diese Zeitschr. **33**, 1911.

Versuche mit Harnsäure.

Es sind 4 Versuche an 4 verschiedenen Enten vorgenommen worden. Den Tieren ist 1 bis 3 g Harnsäure neben dem Futter in den Magen eingeführt worden.

Versuch 1.

Ente 1.

Neben der genau dosierten Maisration sind dem Tiere 3 g Harnsäure (= 1 g N) in den Magen gegeben worden.

Ergebnis: Aller N tritt in den Exkrementen wieder auf, deren gesamter N-Gehalt von 0,4494 g der letzten 48 Stunden des Vorversuches, in den ersten 2 Versuchstagen auf 1,4381 g steigt; also zeigt sich ein Plus von gesamtem N von 0,9887 g. Die Harnsäure, die in den letzten 48 Stunden des Vorversuches in einer Menge von 0,4412 g ausgeschieden worden ist, steigt in den ersten 2 Versuchstagen auf 2,3504 g, sie zeigt also ein Plus von 1,9092. Diese Menge entspricht dem Teile der verfütterten 3 g Harnsäure, der nicht zerstört worden ist.

Versuch 2.

Ente 2.

Dem Tiere werden neben der Tagesration Mais 2 g Harnsäure in den Magen gebracht (= 0,666 g N). Diese Menge N tritt im gesamten N-Gehalt der Exkremente wieder auf. Von der einverleibten Harnsäure treten als solche 1,3317 g wieder zutage (= 0,4239 g Harnsäure-N).

Versuch 3.

Ente 3.

Es wird dem Tiere 1 g Harnsäure in den Magen gebracht (= 0,33 g N). In den Exkrementen findet sich ein Plus an gesamtem N von 0,3261 g. Die Harnsäure derselben steigt von 0,6351 g der letzten 48 Stunden des Vorversuches in den ersten 2 Versuchstagen auf 1,0389 g, weist also ein Plus 0,4038 g auf, was 0,1346 g Harnsäure-N entspricht.

Versuch 4.

Ente 4.

Sie erhält 2 g Harnsäure (= 0,66 g N), in den Exkrementen findet sich ein Plus an gesamtem N von 0,6938 g; von den einverleibten 2 g Harnsäure treten als solche zutage 1,3412 g.

Die Werte dieser Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengestellt.

In allen 4 Versuchen hat es sich gezeigt, daß in den Exkrementen nur ein Teil der einverleibten Harnsäure als solche wieder auftritt, es hat also eine Zerstörung von Harnsäure im Körper stattgefunden.

Tabelle I.

Versuchs-Nr.		Ausgeschieden in 48 Stunden				
		Harnsäure g	Harnsäure-N g	N der Purinbasen g	Purin-N im ganzen g	Gesamter N g
1	Normales Mittel	0,4412	0,1471	0,025	0,1721	0,4494
	Nach Zufuhr von 3 g Harnsäure	2,3504	0,7835	0,028	0,8135	1,4381
	Differenz .	+ 1,9092	+ 0,6364	+ 0,003	+ 0,6414	+ 0,9887
2	Normales Mittel	0,7233	0,2611	0,026	0,2741	0,7224
	Nach Zufuhr von 2 g Harnsäure	2,055	0,685	0,022	0,695	1,3738
	Differenz .	+ 1,3317	+ 0,4239	− 0,004	+ 0,4209	+ 0,6514
3	Normales Mittel	0,6351	0,2117	0,023	0,2347	0,5585
	Nach Zufuhr von 1 g Harnsäure	1,0389	0,3463	0,032	0,3782	0,8836
	Differenz .	+ 0,4038	+ 0,1346	+ 0,009	+ 0,1435	+ 0,3261
4	Normales Mittel	0,7090	0,2363	0,027	0,2633	0,6932
	Nach Zufuhr von 2 g Harnsäure	2,0502	0,6834	0,026	0,7094	1,384
	Differenz .	+ 1,3412	+ 0,4471	− 0,001	+ 0,4461	+ 0,6908

Die Menge der zerstörten Harnsäure ist verschieden, je nach den zugeführten Mengen; wenn man aber die zerstörte Harnsäure mit der einverleibten vergleicht und als Prozentwert darstellt, so zeigt es sich, daß diese Prozente innerhalb enger Grenzen sich bewegen. Dies ist aus Tabelle II ersichtlich, in der die Mengen der einverleibten Harnsäure, die Mengen der ausgeschiedenen und der zerstörten aufgestellt, und daneben die Prozente der zerstörten Harnsäure im Vergleich zur eingeführten, angegeben sind.

Tabelle II.

Vers.-Nr.	Zugeführte Harnsäure g	Wieder ausgeschiedene Harnsäure g	Zerstörte Harnsäure g	Wieder ausgeschiedene Harnsäure %	Zerstörte Harnsäure %
1	3,0	1,9092	1,0908	63,64	36,36
2	2,0	1,3317	0,6683	66,58	33,42
3	1,0	0,4038	0,5962	40,38	59,62
4	2,0	1,3412	0,6588	67,06	32,94

Es ergibt sich aus den in der Tabelle angeführten Werten, daß in Versuch 1, bei dem die Ente 3 g Harnsäure be-

kam, 1,0908 g derselben Säure zerstört worden sind; 0,6683 g der verfütterten 2 g Säure sind im Körper der Ente 2 zerstört worden; 0,5962 g in demjenigen von Ente 3, der 1 g Harnsäure einverleibt worden war; in Versuch 4, bei dem wie bei Versuch 2 die Ente 2 g Harnsäure erhalten hatte, sind von derselben 0,6588 g zerstört worden.

Wenn man die prozentualen Werte der zerstörten Harnsäure betrachtet, so zeigt sich, daß, Versuch 3 ausgenommen, dieselben innerhalb enger Grenzen schwanken. Sie entsprechen bei Versuch 3 59,62 %, bei den Versuchen 1, 2, 4 36,36 %, resp. 33,42 und 32,94 % der verabreichten Harnsäuremenge.

Es ergibt sich also, daß ein beträchtlicher Teil der zugeführten Harnsäure zerstört worden ist, ja man muß bestimmt annehmen, daß in Wirklichkeit das Verhältnis der zerstörten Harnsäure ein noch größeres ist. Da es bei den Vögeln nicht möglich ist, die Faeces vom Urin getrennt zu sammeln und zu untersuchen, kann auch die Menge der wirklich vom Körper aufgenommenen Harnsäure nicht genau bestimmt werden: jedenfalls ist diese Menge etwas geringer als die zugeführte, nach der die Prozente, wie sie in der Tabelle angegeben, berechnet worden sind.

Versuche mit Guanin.

Es ist bekannt, daß bei den Versuchen, die bei Säugern betreffs der Bildung von Harnsäure aus den Purinbasen gemacht wurden, sich diese Säure im Säugerkörper aus Xanthin und Hypoxanthin bilden kann. Die Ergebnisse der Versuche mit Guanin und Adenin hingegen sind nicht eindeutig.

Kossel[1]) konnte beim Hunde nach Verfütterung von Adenin keinerlei Zunahme der Harnsäureausscheidung feststellen. Burian und Schurr[2]) haben die gleichen Resultate am Menschen bei Zufuhr von Guanin erhalten. Nach Krüger und Schmid[3]) hingegen würde Zufuhr von Adenin und wahrscheinlich auch von Guanin die Harnsäureausscheidung erhöhen wie das Xanthin und Hypoxanthin.

Neuerdings haben Schittenhelm und Bendix[4]) beim Kaninchen nach subcutaner und endovenöser Zuführung von Guanin, eine Zunahme der Harnsäureausscheidung feststellen können.

---

[1]) Kossel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 12, 1888.

[2]) Burian und Schurr, Arch. f. d. ges. Physiol. 80, 1900.

[3]) Krüger und Schmid, Zeitschr. f. physiol. Chem. 34, 1902.

[4]) Schittenhelm und Bendix, Zeitschr. f. physiol. Chem. 48, 1905.

Das mußte im Grunde auch von vornherein als sehr wahrscheinlich angesehen werden, nachdem einmal festgestellt war, daß Zufuhr von Nucleinsäure immer, wenn auch je nach den Versuchstieren in verschiedenem Maße, eine Zunahme der Harnsäureausscheidung nach sich zieht; sind doch Guanin und Adenin die hauptsächlichsten Basen der Nucleinsäure.

Die freien Purinbasen würden sich also genau so verhalten, wie wenn sie, in der Nucleinsäure gebunden, dem Organismus zugeführt werden, und man muß annehmen, daß die abweichenden Ergebnisse entweder durch Aufsaugungserscheinungen oder durch das sehr hohe urolytische Vermögen gewisser Tiere (z. B. Hund) zu erklären seien, indem diese Tiere imstande sein können, die im Überschusse gebildete Harnsäure wieder in ihrem Organismus zu zerstören, wenn der Überschuß ein nicht allzu großer ist.

Versuch 5.

Ente 2.

Es wurden dem Tiere nebst der Maisration 0,7 g Guanin in den Magen gebracht, die 0,3245 g N enthalten. Aller N des Guanin tritt in dem gesamten N der Exkremente wieder zutage; die Harnsäuseausscheidung weist ein Plus von 0,1371 g (= 0,0457 g N), und der N der Purinbasen zeigt sich um 0,1675 g vermehrt.

Versuch 6.

Ente 3.

Sie erhält 1 g Guanin (= 0,4636 g N), die Harnsäureausscheidung weist ein Plus von 0,1427 g auf = 0,0476 g N; der N der Purinbasen steigt um 0,2712 g.

Versuch 7.

Ente 5.

Sie erhält 1 g Guanin (= 0,4636 g N), 0,036 g treten als Harnsäure-N wieder auf, 0,1743 g als N der Purinbasen.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle III zusammengestellt.

Es ist aus diesen Ergebnissen zu ersehen, daß bei der Ente die Zufuhr von Guanin eine deutliche und konstante, wenn auch nicht sehr große Zunahme der ausgeschiedenen Harnsäuremenge nach sich zieht; weiter, daß die Zunahme in der Ausscheidung von Purinbasen-N eine weit beträchtlichere ist als die des Harnsäure-N, und endlich daß eine ziemliche Menge

des zugeführten Guanins in einfachere Molekularkomplexe gespalten wird, die den Purinring nicht mehr enthalten.

Tabelle III.

Versuchs-Nr.		Ausgeschieden in 48 Stunden				
		Harnsäure g	Harnsäure-N g	Purinbasen-N g	N d. Purinstoffe im ganzen g	Gesamter N g
5	Normales Mittel	0,7233	0,2411	0,026	0,2671	0,7224
	Nach Zufuhr von 0,7 g Guanin .	0,8604	0,2868	0,1935	0,4803	1,0226
	Differenz	+ 0,1371	+ 0,0457	+ 0,1675	+ 0,2132	+ 0,3002
6	Normales Mittel	0,6351	0,2117	0,023	0,2347	0,5585
	Nach Zufuhr von 1 g Guanin . .	0,7778	0,2593	0,2932	0,5525	0,9455
	Differenz	+ 0,1427	+ 0,0476	+ 0,2712	+ 0,3178	+ 0,3870
7	Normales Mittel	0,8577	0,2859	0,0086	0,2945	0,6129
	Nach Zufuhr von 1 g Guanin . .	0,9660	0,3220	0,1829	0,5049	0,9860
	Differenz	+ 0,1083	+ 0,0361	+ 0,1743	+ 0,2104	+ 0,3731

Tabelle IV.

Versuchs-Nr.	N des einverleibten Guanins g	N der Purinbasen in Plus über die Norm ausgeschieden g	N der Harnsäure in Plus über die Norm ausgeschieden g	Gespaltenes Guanin in N g	In Harnsäure umgewandeltes Guanin %	Als solches oder als Xanthin wieder ausgeschiedenes Guanin %	Gespaltenes Guanin %
5	0,3245	0,1675	0,0457	0,1113	14,08	51,62	34,3
6	0,4636	0,2712	0,0476	0,1448	10,27	58,5	31,23
7	0,4636	0,1743	0,0361	0,2532	7,78	36,6	54,62

Wenn man die Zunahme des Purin-N im ganzen (Harnsäure-N und Purinbasen-N zusammen) nach Zufuhr von Guanin betrachtet, so zeigt sich, daß diese bei den Versuchen 5, 6 und 7 0,2132, 0,3178, 0,2104 g N (siehe Tabelle III) gegenüber von resp. 0,3245, 0,4636 und 0,4636 g N des bei den einzelnen Versuchen verfütterten Guanins beträgt. Es finden sich also 0,1113 g N bei Versuch 5, 0,1448 g bei Versuch 6, 0,2532 g bei Versuch 7, die 0,2401 resp. 0,3124 und 0,5462 g Guanin entsprechen, das nicht wieder auftritt und als weiteren Spaltungen anheimgefallen angesehen werden muß (siehe Tab. IV).

Die Prozente des bei den angeführten Versuchen weiter, in nicht der Puringruppe angehörende Stoffe gespaltenen Guanins sind 34,3 resp. 31,23 und 54,62 %.

Die Prozente des in Harnsäure umgewandelten Guanins sind 14,08 resp. 10,27 und 7,78 %, immer auf das jeweils verfütterte Guanin bezogen.

Das Plus des ausgeschiedenen Purinbasen-N ist 51,62 resp. 58,50 und 36,6 %.

Dieser Purinbasen-N ist von mir in zwei neuen Versuchen festgestellt worden, bei denen ich die gesamte Menge der in den ersten 48 Stunden des Versuches ausgestoßenen Exkremente analysiert habe.

Das Guanin wurde mittels Übersättigung mit Ammoniak ausgefällt, das Xanthin in Form von Chlorhydrat. Aus diesen beiden so erhaltenen Stoffen wurde dann nach Kjeldahl der N bestimmt.

Den Verlauf und die Ergebnisse dieser Versuche gebe ich im folgenden in Kürze wieder.

Versuch 8.

Ente 6.

Nach Einverleibung von 1 g Guanin finden sich in den Exkrementen 0,0843 g N, der dem Guanin entstammt (= 0,1819 g der Substanz), und 0,1428 g N, der dem Xanthin angehört (= 0,3876 g Xanthin).

Versuch 9.

Ente 7.

Nach Einverleibung von 1 g Guanin finden sich in den Exkrementen: 0,1234 g Guanin = 0,0572 g N, 0,3108 g Xanthin = 0,1145 g N.

Aus den beiden Versuchen geht hervor, daß die Purinbasen der Exkremente zum größten Teile aus Xanthin bestehen, dessen Herkunft aus eingeführten Guanin außer Zweifel steht.

Es ist also dargetan, daß der Organismus der Ente eingeführtes Guanin zum Teil in Xanthin umbildet, von dem dann die Harnsäure der Versuche abstammt. Ein großer Teil wird weiter in einfachere Molekularkomplexe gespalten, die den Purinring nicht mehr enthalten. Ein kleiner Teil endlich des zugeführten Guanins tritt als solches in den Exkrementen wieder zutage; da aber diese zusammen mit dem Urin auch die Faeces enthalten und in diesen die Rückstände der Verdauung, so darf wohl mit aller Sicherheit behauptet werden, daß alles oder

doch fast alles Guanin der Exkremente, den unverdauten Rest des eingeführten Guanins darstellt. Daraus folgt auch noch, daß die oben angegebenen Prozente der Harnsäure und des Xanthins, die im Vergleich zur zugeführten Menge des Guanins berechnet worden sind, gegenüber dem wirklich absorbierten Guanin als etwas zu niedrig anzusehen sind.

Versuche mit Nucleinsäure.

Es sind zwei Versuche mit zwei verschiedenen Nucleinsäurepräparaten (Merck) mit verschiedenem Gehalt an Gesamt-N und an Purin-N vorgenommen worden.

Versuch 10.

Ente 1.

Es wurden der Ente neben der dosierten Maisration 3 g Nucleinsäure (aus Tieren) in den Magen gebracht.

Diese Nucleinsäure enthält 13,58 $^0/_0$ Gesamt-N, wovon 3,59 $^0/_0$ Purin-N. Es enthält also die verabreichte Menge Nucleinsäure 0,4074 g Gesamt-N, wovon 0,1077 g N der Purinbasen.

Aus Tabelle V ist zu ersehen, daß in den Exkrementen ein Plus von 0,4412 g Gesamt-N gegenüber dem normalen Mittel der Vorversuche aufgefunden worden ist. Die Harnsäure zeigt ein Plus von 0,6037 g = 0,1975 g N. Der N der Purinbasen weist ein Plus von 0,054 g auf.

Tabelle V.

Versuchs-Nr.		In 48 Stunden ausgeschieden				
		Harnsäure g	N d. Harnsäure g	N d. Purinbasen g	N der ges. Purinstoffe g	Gesamter N g
10	Normales Mittel	0,4412	0,1471	0,025	0,1721	0,4494
	Nach Zufuhr v. 3 g Nucl.-Säure	1,0449	0,3446	0,079	0,4236	0,8906
	Differenz	+ 0,6037	+ 0,1975	+ 0,054	+ 0,2515	+ 0,4412
11	Normales Mittel	2,4291	0,8097	0,0364	0,8461	1,9025
	Nach Zufuhr v. 3 g Nucl.-Säure	2,9751	0,9917	0,0978	1,0895	2,1920
	Differenz	+ 0,5460	+ 0,1820	+ 0,0614	+ 0,2434	+ 0,2905

Versuch 11.

Ente 6.

Sehr starkes, großes Tier, das im Vorversuche durchschnittlich in 48 Stunden 2,4291 g Harnsäure = 0,8097 g N und 1,9025 g N insgesamt ausscheidet.

Man verabreicht 2 g Nucleinsäure aus Hefe, die 13,76 % Gesamt-N und 7,14 % Purinbasen-N enthält. Die verabreichte Menge der Säure enthält also 0,2758 g Gesamt-N, wovon 0,1428 g N der Purinbasen. In den Exkrementen tritt ein Plus gegenüber dem Vorversuche von 0,2905 g Gesamt-N und 0,1820 g Harnsäure-N (= 0,546 g Harnsäure) und 0,0614 g N der Purinbasen auf (s. Tabelle V).

Wenn man die Ergebnisse dieser beiden Versuche mit Nucleinsäure zusammenfassend betrachtet, ergibt sich, daß der gesamte N der zugeführten Nucleinsäure in den Exkrementen wieder auftritt in der Form von Gesamt-N.

Der N der Purinbasen steigt bei Versuch 10 um 0,054 g, bei Versuch 11 um 0,0614 g. Wenn man aber den N der gesamten Purinstoffe (N der Harnsäure + N der Purinbasen) zusammen berücksichtigt, so zeigt sich, daß im Versuch 10 ein Plus von 0,2515 g N der Purinstoffe und im Versuch 11 ein Plus von 0,2434 g N derselben Stoffe zu beobachten war.

Tabelle VI.

Versuchs-Nr.	Zugeführte Nucleinsäure g	Gesamter N der Nucleinsäure g	Purin-N der Nucleinsäure g	Purin-N (N d. Purinbasen + Harnsäure-N) über das norm. Mittel ausgeschied. g	N d. Purinbasen über d. norm. Mittel ausgeschied. g	Synthet. Purin-N (N d. Harnsäure) g
10	3,0	0,4074	0,1077	0,2515	0,054	0,1975
11	2,0	0,2758	0,1428	0,2434	0,0614	0,1822

Wie aus Tabelle VI ersichtlich, ergibt sich, daß in den beiden Versuchen 0,1975 g, resp. 0,1822 g Purin-N mehr, als in den verabreichten Nucleinsäuren in dieser Form enthalten war, ausgeschieden worden sind. Diesem Plus entsprechen Purinstoffe, die sich auf synthetischem Wege gebildet haben müssen, und zwar Harnsäure, die sich auf Kosten der Proteingruppe der Nucleinsäure gebildet hat.

Wenn man nun in Betracht zieht, daß der mehr ausgeschiedene Purinbasen-N vom Purinbasen-N der verabreichten Nucleinsäure abstammt, so folgt, daß das Plus der im Versuche ausgeschiedenen Harnsäure synthetisch gebildet wurde. Denn der Purin-N, der auf oxydativem Wege Harnsäure hätte bilden können, war bei Versuch 10 = 0,0537 g und bei Versuch 11 = 0,0814 g, welchen Mengen gegenüberstehen: 0,1975 g resp. 0,1820 g N des mehr ausgeschiedenen Harnsäure-N (s. Tabelle V).

Ich habe noch die allenfalls nicht aufgesaugte Menge Nucleinsäure bestimmt, indem ich den Purinbasen-N der Exkremente nach Kochen derselben in 0,5%iger Schwefelsäurelösung nach der Methode von Burian bestimmt habe. Aus dem so erhaltenen Purin-N berechnete ich nach Abzug des schon dosierten und bekannten N der freien Purinbasen die Nucleinsäuremenge. In beiden Versuchen ergaben sich ganz minimale Mengen von wiederabgegebener Nucleinsäure, die so gering sind, daß sie bei Deutung der Versuchsergebnisse in keiner Weise ins Gewicht fallen können.

Zusammenfassend ergeben sich aus den hier mitgeteilten Versuchen folgende Schlüsse:

1. Der Organismus der Tiere, die auf synthetischem Wege Harnsäure bilden, besitzt die Fähigkeit, Harnsäure in ziemlich beträchtlicher Menge, und zwar in einem Verhältnisse, das zwischen 33% und 59% der zugeführten Harnsäure schwankt, zu zerstören. Die prozentuale Menge der zerstörten Harnsäure hängt sehr wahrscheinlich von der Menge der zugeführten Harnsäure ab.

2. Dieser Tierorganismus ist weiter imstande, Guanin in Xanthin umzuwandeln und es auch in einfachere Molekularkomplexe zu spalten, die den Purinring nicht mehr enthalten.

3. Aus dem vom Guanin stammenden Xanthin bildet sich eine gewisse Menge Harnsäure, die also oxydativen Ursprung hat.

4. Die Zufuhr von Nucleinsäure zieht eine kleine Zunahme der ausgeschiedenen Purinbasen und ein beträchtliches Plus der Harnsäureausscheidung nach sich. Dieses Harnsäureplus muß als Abkömmling der Proteingruppe der Nucleinsäure aufgefaßt werden.

Beiträge zum Mechanismus der Pepsinverdauung.

Von

Johanne Christiansen (Kopenhagen).

(Aus der physikalisch-chemischen Abteilung der biologischen Versuchsanstalt in Wien.)

(Eingegangen am 4. November 1912.)

Mit 3 Figuren im Text.

I.

Es wird allgemein angenommen, daß die optimale Acidität für die Pepsinverdauung bei einer ziemlich hohen Wasserstoffionenkonzentration liegt. Wegen der immerhin mangelhaften Methoden zur Bestimmung der verdauenden Kraft, sowie auch der bis vor kurzem noch unzureichenden Methoden zur Bestimmung der Acidität, ist jedoch diese Frage bis jetzt nicht einwandfrei entschieden worden. Nur S. P. L. Sörensen[1]) hat die elektrometrische Methode der Wasserstoffionenbestimmung benutzt, seine Methode der Pepsinbestimmung ist aber, wie er selbst angegeben hat[2]), nicht einwandfrei. Die meisten übrigen Untersucher (Schütz und Huppert[3]), Slis[4]), Krüger[5]), Croner[6]) und viele andere) haben sich sehr unzuverlässiger Methoden der Aciditätsbestimmung bedient.

Außerdem finden bei der Pepsinverdauung neben- und nacheinander verschiedene Vorgänge statt, die noch einer genaueren Analyse bedürfen. Namentlich muß man, wie es neuer-

---

[1]) S. P. L. Sörensen, diese Zeitschr. **21**, 131, 1909.
[2]) S. P. L. Sörensen, Ergebn. d. Physiol. **12**, 393, 1912.
[3]) Schütz und Huppert, Arch. f. d. ges. Physiol. **80**, 470, 1900.
[4]) J. Slis, Ref. im Chem. Centralbl. **1**, 1300, 1900.
[5]) Fr. Krüger, Zeitschr. f. Biol. **41**, 467, 1901.
[6]) W. Croner, Virchows Archiv **150**, 260, 1897.

lich Abderhalden und Steinbeck[1]) hervorgehoben haben, zwei Wirkungen des Pepsins getrennt betrachten, nämlich: erstens die Lösung koagulierten Eiweißes, zweitens die Verdauung von genuinem flüssigen Eiweiß. Es ist ja durchaus nicht notwendig und auch gar nicht einmal wahrscheinlich, daß dieselben Gesetze in diesen beiden Fällen Geltung haben müssen. Die Bestimmung der Lage des Aciditätsoptimums bei der Lösung von koaguliertem Eiweiß war u. a. der Gegenstand einer vorhergehenden Abhandlung[2]), und das Resultat war eine Bestätigung der früheren Auffassung, daß für diesen Prozeß das Vorhandensein einer großen Menge überschüssiger freier Salzsäure am günstigsten ist.

In der folgenden, von Prof. Pauli angeregten Untersuchung ist es die nächste Aufgabe gewesen, der zweiten Frage näherzutreten, also zu prüfen, ob auch die Verdauung des genuinen Eiweißes bei Überschuß von freier Salzsäure gefördert wird.

Die Methode, die zur fortlaufenden Feststellung der Pepsinwirkung gewählt wurde, war die im hiesigen Laboratorium viel benutzte Viscositätsbestimmung, die zuerst von Spriggs[3]) zur Verfolgung der Proteolyse gebraucht worden ist. Unsere Technik der Viscosimetrie weicht von der seinigen ab. Namentlich ist es nach den hier schon früher gemachten Erfahrungen ganz unnötig, besondere Vorkehrungen zur Erzielung eines konstanten Druckes zu treffen. Die methodischen Details sind übrigens in den Arbeiten aus dem hiesigen Institute (namentlich in der Arbeit von Schorr[4]) eingehend beschrieben worden, und es soll daher hier auf diese verwiesen sein. Der Wasserwert der gebrauchten Viscosimeter war 108,6 Sek. Indem das Viscosimeter in einem durchsichtigen Ostwaldschen Thermostaten mit Rührwerk und Thermoregulator angebracht wurde, konnte die Temperatur immer konstant auf 25° erhalten werden.

Die Bestimmung der Acidität geschah durch Titration mit dem Günzburgschen Reagenz als Indicator: Diese Methode liefert, wie aus einer früheren Abhandlung[5]) hervorgeht, brauch-

---

[1]) E. Abderhalden und E. Steinbeck, Zeitschr. f. physiol. Chem. **68**, 292, 1910.

[2]) Johanne Christiansen, diese Zeitschr. **46**, 257, 1912.

[3]) E. J. Spriggs, Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 465, 1902.

[4]) C. Schorr, diese Zeitschr. **37**, 424, 1911.

[5]) Johanne Christiansen, diese Zeitschr. **46**, 24, 1912.

bare Werte für die freie Salzsäure, und ist auch zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration bei höheren Aciditäten verwendbar, da unter solchen Umständen die Wasserstoffionenkonzentration nur von freien starken Säuren herrühren kann. Dies wurde jedoch in der erwähnten Abhandlung nur für Albumosen und Peptone erwiesen. Daß diese Methode aber auch für genuines dialysiertes Eiweiß angewendet werden kann, haben im hiesigen Laboratorium ausgeführte Untersuchungen gezeigt, indem die elektrometrischen Wasserstoffionenbestimmungen und die parallel ausgeführten Günzburg-Titrierungen an Mischungen von dialysiertem Eiweiß und Salzsäure, wie die folgende Tabelle I zeigt, korrespondierende Werte lieferten.

Tabelle I.

Dialysiertes Rinderserum.

Eiweiß-konzentration %	Gesamt-Salzsäure-konzentration	C_H	G	C_{H}· aus den G.-Zahlen berechnet
0,808	0,005	0,00025	0	0
—	0,007	0,00073	0	0
—	0,010	0,00187	0	0
—	0,020	0,00865	8	0,0077
—	0,030	0,0156	18	0,0172

Die Wasserstoffionenbestimmungen sind von den Herren K. Manabe (Tokio) und J. Matula anläßlich anderweitiger Untersuchungen am Institute ausgeführt worden.

In der Tabelle bedeutet C_H die Wasserstoffionenkonzentration. Die Günzburg-Zahlen (G) bedeuten die Anzahl von $^1/_{10}$ ccm $^n/_{10}$-NaOH, die zur Neutralisation der in 10 ccm gegenwärtigen freien Salzsäure nötig waren. Diese Zahlen entsprechen also der mit 1000 multiplizierten tatsächlichen Konzentration an freier HCl. Die Berechnung der H·-Ionenkonzentrationen aus den Günzburg-Zahlen geschah durch graphische Interpolation mit Hilfe der von Kohlrausch für die Dissoziationsgrade der Salzsäure angegebenen Daten.

Die Tabelle zeigt eine für unsere Zwecke praktisch genügende Übereinstimmung zwischen den beobachteten und den aus den Günzburg-Zahlen berechneten C_H-Werten, indem die Differenz innerhalb der Fehlergrenze der Günzburg-Titrierungen (0,002) liegt.

Es ist aus den Untersuchungen von Pauli und Handovsky[1]) bekannt, daß die Viscosität von Säure-Eiweißmischungen mit zunehmender Säuremenge bis zu einem Maximum steigt, das nach Paulis Theorie dem Maximum der anwesenden Eiweißionen entspricht. Bei weiterem Zusatz von Salzsäure nimmt die Viscosität wieder ab. Unsere Untersuchungen mußten demzufolge darauf gerichtet sein: 1. eine Reibungskurve für das zu untersuchende Serum bei steigendem HCl-Zusatz zu konstruieren; 2. die Acidität dieser Mischungen durch Günzburg-Titration zu messen; 3. die Viscositätsänderung durch Zusatz von Pepsin bei verschiedenen Aciditäten zu beobachten.

Das verwendete Serum war ein vorzüglich dialysiertes Rinderserum, dessen Stickstoffgehalt 0,259 %, und dessen Eiweißgehalt 1,616 % betrug. Bei den Versuchen kam immer dieselbe Eiweißkonzentration, nämlich 0,808 % zur Verwendung, indem das Serum mit gleichem Raumteile von Salzsäure verschiedener Konzentrationen gemischt wurde.

Tabelle II.
Dialysiertes Rinderserum.

Eiweiß %	Gesamt-HCl-Konzentration	Durchströmungszeit in Sekunden		Günzburg-Reaktion in der unfiltrierten Mischung	Günzburg-Reaktion in der filtrierten Mischung
		unfiltrierte Mischung	filtrierte Mischung		
1,616	0	118,2	118,0	0	0
0,808	0	112,4	112,4	0	0
—	0,002 n	114,6	112,4	0	0
—	0,004 „	117,2	113,0	0	0
—	0,006 „	123,0	117,6	0	0
—	0,008 „	128,0	122,8	0	0
—	0,010 „	130,8	125,0	0	0
—	0,012 „	132,2	129,2	+	0
—	0,014 „	181,8	129,6	+	+
—	0,016 „	130,8	—	+	
—	0,018 „	129,6	128,8	+	+
—	0,020 „	128,8	128,8	+	+
—	0,022 „	128,0	—	+	
—	0,025 „	126,4	126,4	+	+
—	0,030 „	123,8	—	+	
—	0,035 „	123,0	123,0	+	+
—	0,040 „	121,6	—	+	
—	0,050 „	120,2	—	+	
—	0,100 „	117,0	—	+	
—	0,200 „	116,3	—	+	

[1]) W. Pauli und Handovsky, diese Zeitschr. 18, 340, 1909.

Die Änderungen der Viscosität dieses Eiweißes bei steigendem Säurezusatz sind auf Fig. 1 (die voll ausgezogene Kurve) graphisch dargestellt worden. Auf der Abszisse sind die zugesetzten Salzsäuremengen, auf der Ordinate die Durchströmungszeiten in Sekunden angegeben. In der Tabelle II finden sich diese Werte tabellarisch geordnet. Aus der Kurve geht hervor, daß die Viscosität mit steigendem Säurezusatz sehr stark ansteigt, um bei 0,012 n-HCl das Maximum zu erreichen und sich dann wieder langsam zu vermindern.

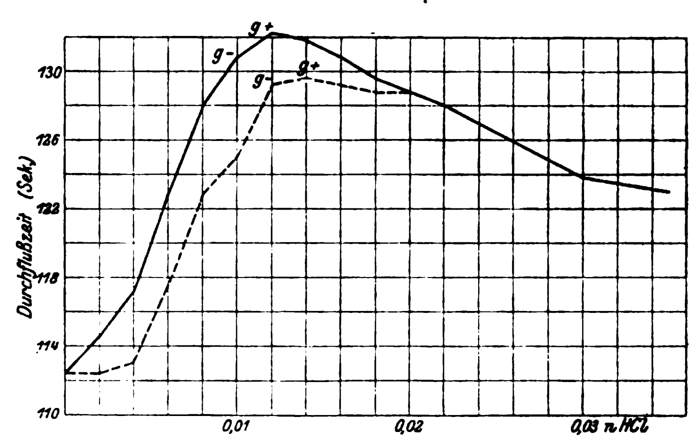


Fig. 1. Rinderserum.

Bei der Bestimmung der freien Salzsäuremenge in diesen Mischungen mittels Günzburg-Titrierung ergab sich das eigentümliche Verhältnis, daß freie Salzsäure eben erst im Viscositätsmaximum nachgewiesen werden konnte[1]). So zeigte eine Mischung von den Gesamt-Salzsäurekonzentrationen 0,010 n und 0,011 n noch keine Reaktion mit Günzburg-Reagens, während die Mischung 0,012 n, bei der, wie erwähnt, das Maximum der Viscosität dieser Versuchsreihe liegt, eben eine Andeutung der Reaktion aufwies. Bei Mischungen von 0,013, 0,014 n-HCl usw. traten kräftigere Reaktionen auf. Diese Erscheinung bestätigt in schlagender Weise die Annahme W. Paulis, daß der Anstieg der Viscosität bis zum Maximum

[1]) Nähere Daten in dieser Richtung bringt die demnächst erscheinende Arbeit von Manabe und Matula.

dadurch seine Erklärung findet, daß Salzsäure vom Eiweiß gebunden wird, und dieses Salz in Chlorionen und positive Eiweißionen dissoziiert. Diese letzteren bedingen durch ihre bedeutende Hydratation die große Viscosität dieser Lösungen. Durch Überschuß von Salzsäure wird die Dissoziation zurückgedrängt, und die Viscosität nimmt daher ab.

Um dieses Verhältnis sicherzustellen, wurde ein zweiter Eiweißstoff, nämlich Hammelalbumin, das durch Aussalzen von Hammelserum mit Ammonsulfat und nachfolgender Dialyse des in Lösung verbliebenen Albumins gewonnen worden war, in derselben Weise untersucht (N-Gehalt 0,42 %, Eiweißgehalt 2,62 %). Die mit diesem Eiweiß gewonnenen Zahlen sind in Tabelle III zusammengestellt worden. Die entsprechende graphische Darstellung findet sich in Fig. 2 (die voll ausgezogene Kurve). Auch bei dieser Versuchsreihe zeigte sich eben im Reibungsmaximum (bei 0,018 n-HCl) die erste Spur einer Reaktion mit Günzburg-Reagens.

Tabelle III.

Dialysiertes Hammelalbumin.

Eiweiß %	Gesamt-HCl-Konzentration	Durchströmungszeit in Sekunden		Günzburg-Reaktion in der unfiltrierten Mischung	Günzburg-Reaktion in der filtrierten Mischung
		unfiltrierte Mischung	filtrierte Mischung		
2,62	0	123,4	123,4	0	0
1,31	0	115,2	115,2	0	0
—	0,005	124,4	118,0	0	0
—	0,010	140,0	127,6	0	0
—	0,016	153,0	141,6	0	0
—	0,018	153,6	145,2	+	0
—	0,020	152,6	146,2	+	+
—	0,030	145,2	145,2	+	+
—	0,040	140,4	140,4	+	+

Bei der Ausführung dieser Versuchsreihen wurden einige interessante Beobachtungen über die Adsorption von Eiweißlösungen durch Filtrierpapier gemacht, die nicht nur wegen der methodischen Aufklärung über die richtige Filtration der Eiweißlösungen vor der Viscosimetrie, sondern auch allgemeines Interesse beanspruchen können.

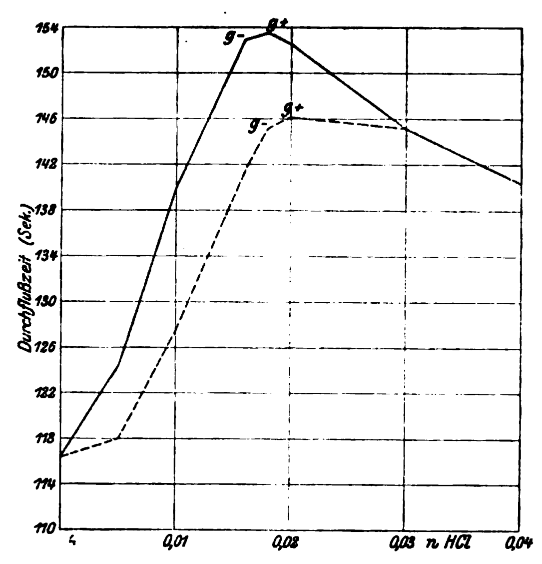


Fig. 2. HCl + Serumalbumin (Hammel).

II.

Es ist jedem, der mit einem Viscosimeter gearbeitet hat, bekannt, daß die Lösungen sehr gut filtriert sein müssen, weil kleine Verunreinigungen sich leicht in der Capillare festsetzen und zu falschen Werten führen können. Es zeigte sich indessen, daß diese Filtrierung durchaus keine indifferente Manipulation ist, indem bei gewissen Mischungen von Säure und Eiweiß eine sehr große Änderung der Viscosität durch Filtrierung resultierte, während sowohl bei nativem Eiweiß ohne Säure wie auch bei stärkerem Säuregehalt die Viscosität nicht merkbar beeinflußt wurde. Es handelt sich also nicht um eine einfache Abnahme der Lösung an Eiweißgehalt, wie dies von D. Fraser Harris[1]) bei Filtration durch Chamberland-Filter, von A. F. Hertz[2]) bei Filtration durch tierische Membranen nachgewiesen wurde; der Fehler scheint vielmehr von der physiko-chemischen Struktur der Lösungen als vom absoluten Eiweißgehalt abzuhängen. Eine Mischung, die 1,31 $^0/_0$ Hammelalbumin und 0,010 n-HCl enthält, besitzt z. B. die Durchströmungszeit 140 Sek., während dieselbe Mischung im filtrier-

[1]) D. Fraser Harris, Journ. of Physiol. 25, 207, 1900.

[2]) A. F. Hertz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 48, 347, 1906.

ten Zustande in 127,6 Sek., also um 12,4 Sek. schneller durch das Viscosimeter strömt. Eine 2,62 %ige Lösung von Hammelalbumin ohne Säure hat dagegen die Durchströmungszeit 123,4 Sek. sowohl vor wie nach Filtrierung, und dasselbe gilt für eine Mischung von 1,31 % Hammelalbumin und 0,030 n-HCl, die sowohl vor wie nach Filtrierung in 145,2 Sek. durch das Viscosimeter strömt. Dieses Verhalten schien also mit der Ionisation des Eiweißes in Zusammenhang zu stehen, und es war daher von Interesse, systematisch eine größere Anzahl Bestimmungen zu machen. Die Versuche wurden derart ausgeführt, daß die aus den klar filtrierten Komponenten hergestellte und die filtrierte Mischung zur selben Zeit in zwei Viscosimetern im gleichen Thermostaten untersucht wurden. Die Temperatur war 25° (und variierte höchstens um 0,1°). Die beiden Viscosimeter hatten infolge eines seltenen Zufalls ganz denselben Wasserwert (108,6 Sek.), so daß es möglich war, die Durchströmungszeiten ohne Umrechnung zu vergleichen. Die Filtrierungen geschahen immer in derselben Weise: ca. 15 ccm wurden 4 mal durch ein doppeltes Filter von einem Durchmesser von 9 cm geschickt. Bei den Versuchen der Tabelle III wurde gewöhnliches Filtrierpapier, bei jenen der Tabelle II eine dichtere Papiersorte von Schleicher & Schüll benutzt. Übrigens hatte auch schon einmaliges Filtrieren durch einzelne Filter einen großen Einfluß auf die Viscosität der betreffenden Lösungen.

In Fig. 1 (S. 230) und Fig. 2 (S. 232) sind die Resultate graphisch dargestellt. Die voll ausgezogenen Kurven betreffen die unfiltrierten, die punktierten die entsprechenden filtrierten Lösungen. Die Abszisse bedeutet die Gesamtsalzsäurekonzentration, die Ordinate die Durchströmungszeit, in Sekunden angegeben. Die Kurven zeigen deutlich, wie die einander entsprechenden Werte für die filtrierten und die unfiltrierten Lösungen im aufsteigenden sowie im ersten Teil der absteigenden Kurve bedeutend auseinandergehen, während die ursprünglichen und die stärker sauren Lösungen dieselben Werte haben, ob sie nun filtriert sind oder nicht. Die Unterschiede sind am größten im Maximum der Kurve, so daß also die Annahme nahe lag, daß es nur die hydratisierten Eiweißionen sind, die vom Filter adsorbiert werden; wenn diese praktisch fehlen,

wie beim neutralen oder beim stärker sauren Eiweiß, wo sie durch Zurückdrängung der Dissoziation wieder verschwunden sind, findet auch keine Adsorption seitens des Filtrierpapiers statt. Die Sache scheint indessen nicht so einfach zu sein: Filtriert man eine neutrale Eiweißlösung, so wird dadurch keine Änderung der Viscosität bewirkt. Setzt man aber zu 5 ccm von diesem filtrierten Eiweiß 5 ccm 0,012 n-HCl hinzu, so daß also die Salzsäurekonzentration 0,006 n beträgt, so zeigt sich eine deutliche Abnahme der Viscosisät gegenüber jener derselben Mischung mit unfiltriertem Eiweiß. Die Abnahme ist jedoch nicht so groß, als wenn man nach der Mischung filtriert. Die folgende Tabelle IV zeigt solche Beispiele.

Tabelle IV.

	Gesamt-HCl-Konzentration	Durchströmungszeit i. Sekunden		
		Serum vor der Mischung		nach der Mischung
		unfiltriert	filtriert	filtriert
0,808 % Rinderserum . . .	0,006 n	123,0	121,6	117,6
do.	0,035 n	123,0	123,0	123,0
1,31 % Hammelalbumin . .	0,010 n	140,0	135,4	127,6
do.	0,020 n	152,6	151,6	146,2
do.	0,030 n	145,2	145,2	145,2

Die Tabelle zeigt ferner, daß die Filtrierung des neutralen Serum vor der Mischung mit Salzsäure in analoger Weise wie die Filtrierung nach der Mischung nur im aufsteigenden Teil der Kurve einen Einfluß auf die Viscosität ausübt. Bei höheren Aciditäten ist es ganz gleichgültig, ob man vor oder nach der Mischung filtriert, oder ob man überhaupt filtriert. Die bei niedrigen Aciditäten hervorgebrachte Änderung ist, wenn man vor der Mischung filtriert, bedeutend geringer als wenn man nach der Mischung filtriert, und der Einfluß der Adsorption von neutralem Eiweiß seitens des Filtrierpapiers ist zweifellos in Wirklichkeit noch geringer als es aus diesen Versuchen erscheint, weil ja die Filtrierung vor der Mischung in einer doppelt so großen Konzentration von Eiweiß, wie die Filtration nach der Mischung, erfolgt.

Man muß also annehmen, daß ein sehr geringer Teil vom neutralen Eiweiß — vielleicht rührt er von den auch hier an-

wesenden Eiweißionen her — im Filter zurückbleibt. Dieser Teil muß aber so gering sein, daß es nur in dem steil aufsteigenden Teile der Kurve, wo überhaupt ganz kleine Unterschiede große Ausschläge geben, bemerkbar wird. Dagegen muß wahrscheinlich der größte Teil der Abnahme von der Adsorption der neugebildeten Eiweißionen herrühren; doch ist hier die Mitwirkung eines weiteren Faktors nicht ausgeschlossen. Es besteht nämlich noch ein zweites, die Verhältnisse komplizierendes Moment, indem auch ein kleiner Teil der freien Salzsäure vom Filter adsorbiert wird.

Filtriert man z. B. in gewöhnlicher Weise jene Lösungen der Tabellen II und III, die die maximale Viscosität aufweisen und also eben die Reaktion mit Günzburgs Reagens geben, dann gibt die filtrierte Lösung nicht mehr diese Reaktion. Diese Verringerung der Menge freier Salzsäure bedingt auch die aus den Kurven ersichtliche Erscheinung, daß nämlich der Höhepunkt der punktierten Kurven (Filtrate) ein wenig gegen die saure Seite hin verschoben ist. Auch diese Kurven bestätigen also die früher erwähnte Beobachtung, daß das Auftreten von freier Salzsäure mit dem Maximum der Viscosität zusammenfällt. Daß Salzsäure von verschiedenen Körpern (Tierkohle, Talcum usw.) sehr leicht adsorbiert wird, ist ja allgemein bekannt; in unserem Falle muß daher die Möglichkeit erwogen werden, ob vielleicht der ganze Einfluß des Filtrierens auf die Adsorption von Salzsäure zurückzuführen ist. Dieses ist indessen nicht wahrscheinlich, denn in einem solchen Falle müßte die Viscosität im absteigenden Teile der Kurve nach der Filtrierung zunehmen; statt dessen nimmt sie aber ab bzw. bleibt unverändert. Sicher überwiegt also der am Eiweiß selbst sich vollziehende Adsorptionsprozeß.

Trotz der Kompliziertheit der Sache kann mit größter Wahrscheinlichkeit gesagt werden, daß wir es hier mit einer bisher nirgends hervorgehobenen Eigenschaft der Eiweißionen zu tun haben, nämlich mit einer besonders starken Adsorbierbarkeit durch Filter.

Um ausfindig zu machen, inwieweit diese Adsorption von dem Vorzeichen der elektrischen Ladung abhängig ist, wurde eine entsprechende Versuchsreihe mit Mischungen von Eiweiß und Natronlauge ausgeführt.

Es ist am Institut von C. Schorr[1]) nachgewiesen worden, daß solche Mischungen, von einer gewissen Natriumhydroxyd-Konzentration an, sehr instabil sind, indem ihre Viscosität im Laufe kurzer Zeit erst zu-, später wieder abnimmt. Die oben beschriebene Versuchsanordnung, bei welcher die Bestimmungen der Viscosität der filtrierten und der unfiltrierten Lösung gleichzeitig im selben Wasserbad mit zwei gleichwertigen Viscosimetern vorgenommen wurden, ist daher bei diesen Versuchen von besonderer Bedeutung.

Tabelle V.

Rinderserum.

Eiweiß-Konzentration %	NaOH-Konzentration	Durchströmungszeit in Sekunden		Zeitliche Änderung der Viscosität	Beobachtungszeit Min.	Anfangswert Sek.	Schlußwert Sek.
		unfiltrierte Mischung	filtrierte Mischung				
0,808	0,004 n	115,8	115,8	unverändert	55		
—	0,008 „	118,6	116,4	—	24		
—	0,012 „	120,6	118,6	—	16		
—	0,016 „	126,2	124,2	—	49		
—	0,020 „	128,4	127,8	steigend	53	126,2	128,4
—	0,024 „	130,2	130,2	—	64	128,2	130,2

Die Versuche zeigen den früheren ganz entsprechende Verhältnisse, nur sind die Unterschiede zwischen den Viscositäten der filtrierten und der unfiltrierten Lösungen etwas geringer als beim Säureeiweiß. Auch beim Laugeneiweiß findet sich die Abnahme der Viscosität durch Filtrieren nur bei schwächeren Natriumhydroxyd-Konzentrationen (von 0,008 n an), während die Durchströmungszeit bei stärkeren Konzentrationen (0,024 n) unverändert bleibt. In jenem Punkte aber, wo die Lösungen anfangen instabil zu werden, beginnen auch die Werte für die filtrierten und die unfiltrierten Lösungen sich einander zu nähern. Auch die negativen Eiweißionen scheinen also stärker adsorbierbar wie neutrales Protein zu sein, wenn auch bei weitem nicht so stark wie die positiven.

Die praktische Konsequenz dieser Filtrierungsversuche ist natürlich die, daß man für eine ganze Versuchsreihe

[1]) C. Schorr, diese Zeitschr. 37, 224, 1911.

nur im voraus gut filtrierte klare Eiweißlösungen verwenden darf und, wie dies im Institut immer geschieht, alle Zusätze nach der Filtration vorzunehmen sind. Wird das Eiweiß später, z. B. durch Toluol getrübt, so kann sich die Notwendigkeit ergeben, es nochmals zu filtrieren. Die mit diesem neuerlich filtrierten Serum gewonnenen Resultate sind aber mit den früheren nicht direkt vergleichbar, weil das Serum durch das Filtrieren ein wenig verdünnt worden ist.

III.

Wie schon erwähnt, hat E. J. Spriggs[1]) auf Veranlassung von Kossel zum ersten Male die Änderung der Viscosität von Eiweißlösungen durch Pepsinzusatz verfolgt. Er fand, daß Eiweißlösungen durch Einwirkung von Salzsäure bei 38° einen aus der Viscositätsabnahme ersichtlichen Abbau erleiden; dieser Abbau erscheint bei Pepsinzusatz bedeutend gesteigert. Spriggs gibt keine genaue Auskunft über die Acidität, bei der er gearbeitet hatte; außerdem hatte er kein dialysiertes Eiweiß verwendet. Er meint selbst, daß es sehr wünschenswert wäre, dialysiertes Eiweiß für solche Versuche zu gebrauchen; es ist ihm aber nicht gelungen, ein solches mit genügend großer Viscosität herzustellen. Die Ursache davon liegt jedoch wahrscheinlich nur darin, daß er mit einem Viscosimeter von zu geringem Wasserwert (73,1 Sek.) gearbeitet hat. In unserem Laboratorium sind schon vor einigen Jahren von R. Wagner nicht weiter veröffentlichte viscosimetrische Versuche über den peptischen Abbau von dialysiertem Serum ausgeführt worden. Er hatte mit Pepsin. pur. absol. in lamell. (Merck) bei der dem Viscositätsmaximum seines Serumalbumins entsprechenden Acidität (etwa bei 0,015 n-HCl) gearbeitet und konnte feststellen, daß diese Methode außerordentlich empfindlich ist, indem sie auch bei Zimmertemperatur und sehr kleinen Pepsinmengen deutliche Unterschiede anzeigt.

Unsere Versuche sollten, wie schon früher erwähnt, den Einfluß der Acidität auf die Pepsinwirkung untersuchen. Das verwendete Serum war dasselbe dialysierte 1,616 $^0/_0$ige Rinderserum, mit dem schon ein Teil der Filtrationsversuche aus-

[1]) E. J. Spriggs, Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 1902.

geführt worden war (Fig. 1). Um untereinander vergleichbare Kurven über die Reibungsabnahme infolge der Pepsineinwirkung zu erhalten, wurden immer je zwei Lösungen gewählt, die die gleiche Anfangsviscosität besaßen, von denen aber die eine, ihrer Acidität zufolge, den entsprechenden Viscositätspunkt im aufsteigenden, die andere hingegen im absteigenden Teile der Reibungskurve hatte. Auf diese Weise wurden drei Salzsäure-Eiweißmischungen, deren entsprechende Viscositäten alle im aufsteigenden Teile der Kurve lagen (die Mischungen besaßen daher alle keine freie Salzsäure) mit drei anderen verglichen, deren Viscositäten dem absteigenden Teile der Kurve angehörten (demnach alle freie Salzsäure enthielten). Die gewählten Aciditäten zugesetzter (nicht freier) Salzsäure waren die folgenden: 1. 0,006 n und 0,035 n, welchen beiden eine Durchflußzeit von 123,0 Sek. entsprach, 2. 0,008 n und 0,022 n mit der entsprechenden Durchflußzeit von 128,0 Sek. und 3. 0,010 n und 0,016 n mit einer entsprechenden Durchflußzeit von 130,8 Sek.

Die Versuche wurden so vorgenommen, daß die beiden Lösungen von derselben Viscosität gleichzeitig in zwei Viscosimetern (mit dem gleichen Wasserwert von 108,6 Sek.) untersucht wurden. Die Pepsin-Salzsäurelösung, sowie das Serum wurden jedes für sich im Thermostaten (25^{0}) 10 Minuten lang vorgewärmt, dann gemischt und gleich darauf die Durchströmungszeit bestimmt. Diese erste Bestimmung erfolgte in der Regel 3 Minuten nach der Mischung. Die Viscositätsabnahme wurde während zweier Stunden durch sehr häufige Bestimmungen verfolgt. Die Resultate sind in der Tabelle VI gesammelt. In Kontrollversuchen wurde untersucht, ob Säure allein eine merkliche Abnahme innerhalb der Versuchszeit bewirken kann; es zeigte sich, daß dies nicht der Fall war. Erst nach 24 Stunden war eine Abnahme (um höchstens 2 Sekunden) zu konstatieren. Auch nach Spriggs erfolgt der Abbau durch pure Salzsäure nur bei 38^{0} einigermaßen schnell, bei Zimmertemperatur aber sehr langsam. Weitere Kontrollversuche bezweckten, festzustellen, ob inaktiviertes Pepsin in den verwendeten sehr schwachen Konzentrationen einen wahrnehmbaren Einfluß auf die Viscosität ausübt; dies war aber gleichfalls nicht der Fall. Bei diesen letzten Versuchen wurde die Erfahrung gemacht, daß es nicht

möglich ist, 1 %iges Pepsin. pur. (Merck) in wässeriger Lösung durch kurzdauerndes Kochen vollständig zu inaktivieren; erst wenn es mit Salzsäure gekocht wird, zeigt es sich im Viscosimeter nicht mehr wirksam. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung P. Liebmanns[1]), der fand, daß Pepsin viel besser in wässeriger als in salzsaurer Lösung haltbar ist.

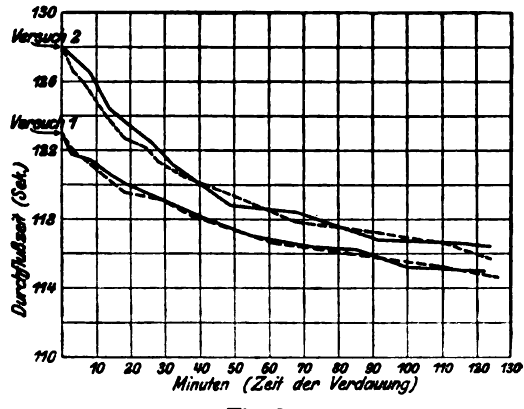


Fig. 3.

Die Tabelle VI zeigt, daß die Lösungen, die die gleiche anfängliche Viscosität besaßen, unter Pepsineinfluß mit gleicher Schnelligkeit in bezug auf ihre Viscosität abnehmen, ganz gleichgültig, ob freie Salzsäure zugegen ist oder nicht. Die Versuche 1 und 2, die in Fig. 3 graphisch dargestellt sind, zeigen dies besonders deutlich. Die voll ausgezogenen Kurven entsprechen den Lösungen ohne freie Salzsäure (Versuch 1: 0,006 n-Gesamt-HCl und Versuch 2: 0,008 n-Gesamt-HCl). Die gestrichelten Kurven entsprechen den Lösungen mit freier HCl (Versuch 1: 0,035 n-Gesamt-HCl und Versuch 2: 0,022 n-Gesamt-HCl). Der Versuch 3 zeigt einen kleinen Unterschied, indem die Viscosität der Lösung ohne freie Salzsäure (0,01 n-HCl) ein wenig schneller als die der Lösung mit freier Salzsäure (0,016 n-HCl) abnimmt. Der Unterschied übersteigt jedoch nicht eine Sekunde, und wir möchten deshalb vorläufig einen — wenn auch ungewöhnlich großen — Versuchsfehler nicht ganz ausschließen.

[1]) P. Liebmann und L. Johannesen, Ugeskrift for Läger. 1911, Nr. 25.

Tabelle VI.

Durchflußzeiten von 0,808 % Rinderserum + 0,002 % Pepsin + variierende Säuremengen.

	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
Gesamt-Salzsäure	0,006 n	0,035 n	0,008 n	0,022 n	0,010 n	0,016 n
Konz. freier Salzsäure . . .	0	0,023 n	0	0,010 n	0	0,004 n
Kontrolle (ohne Pepsin) . .	123,0	123,0	128,0	128,0	130,8	130,8
Nach 3 Minuten	121,8	122,0	—	126,6	130,0	129,8
„ 6 „	—	—	—	126,0	128,6	128,4
„ 8 „	121,4	—	126,6	—	—	—
„ 12 „	—	120,6	—	124,2	125,8	126,4
„ 14 „	120,6	—	124,4	—	125,2	125,4
„ 16 „	—	—	124,0	—	—	—
„ 18 „	—	119,6	—	122,8	—	—
„ 19 „	120,0	—	—	—	—	—
„ 24 „	—	—	—	122,2	—	123,8
„ 26 „	—	—	122,4	—	—	—
„ 28 „	—	119,2	—	121,4	122,2	123,0
„ 32 „	—	—	121,2	—	—	—
„ 34 „	—	—	—	120,6	—	122,0
„ 36 „	—	—	120,4	—	120,6	—
„ 38 „	—	118,2	—	—	—	—
„ 45 „	117,8	—	—	—	—	—
„ 49 „	—	—	118,8	119,4	119,0	—
„ 55 „	117,0	—	—	—	—	119,6
„ 58 „	—	—	—	—	—	119,2
„ 61 „	—	116,6	—	—	118,0	—
„ 68 „	—	—	118,4	117,8	—	—
„ 73 „	116,4	—	—	—	—	118,4
„ 82 „	—	—	—	—	116,8	—
„ 85 „	116,2	—	—	117,4	—	—
„ 91 „	—	—	116,8	—	—	—
„ 96 „	—	115,6	—	—	—	—
„ 100 „	115,2	—	—	—	—	—
„ 103 „	—	—	—	—	116,4	117,4
„ 111 „	—	115,2	—	116,6	—	—
„ 115 „	—	—	116,6	—	—	—
„ 117 „	—	—	—	—	116,2	—
„ 121 „	115,0	—	—	—	—	117,2
„ 124 „	—	—	116,4	115,8	—	—
„ 127 „	—	114,6	—	—	115,8	116,8
„ 133 „	—	—	—	—	—	—

Nach diesen Versuchen wollen wir nur aussagen, daß, falls überhaupt ein Aciditätsoptimum dieser Pepsinwirkung existiert, ein solches in der Nähe des Viscositätsmaximums, also eben beim Ionisationsoptimum des Eiweißes, oder beim ersten Auftreten der freien Salzsäure gelegen sein muß. Allerdings müssen wir diese Schlußfolgerung zunächst nur auf die als Viscositätsabnahme in die Erscheinung tretende Pepsinwirkung einschränken.

Läßt man die Lösungen z. B. 24 Stunden stehen, so geht die Viscosität noch weiter zurück und erreicht zuletzt den gleichen Wert, den die reine wässerige Eiweißlösung hat, in unserem Falle also 112,4 Sekunden. Auch bei der Verdauung im Thermostaten erreicht die Viscosität gerade diesen Wert, und zwar ganz unabhängig von der anwesenden Säuremenge. Die durch die Pepsinverdauung gebildeten Abbauprodukte verhalten sich also Säure gegenüber ganz anders als das genuine Eiweiß; die hohe innere Reibung ist vor allem eine Eigenschaft der Ionen des genuinen salzfreien Eiweißes, denn die Eigenschaft verschwindet mit fortschreitender Verdauung[1]).

IV.

Die Ergebnisse der ausgeführten Pepsinversuche stimmen mit den mit Hilfe der Mettschen Methode gewonnenen Resultaten nicht überein. Es war daher von Interesse, zu untersuchen, inwiefern hier besondere Umstände die Differenzen veranlassen. Namentlich mußte man an einen möglichen Einfluß seitens der Salze denken, da ja bei Metts Methode bisher gewöhnliches Eiweiß und nicht — wie bei unseren Viscositätsbestimmungen — dialysiertes Eiweiß verwendet wurde. Leider ist es schwierig, dialysiertes Eiweiß von genügend großer Konzentration für diese Methode herzustellen. Dagegen war es denkbar, daß man durch Dialyse den Salzgehalt in den Mettschen Eiweißröhrchen verringern könnte. Röhrchen mit koaguliertem Eiweiß[2]) von ca. 3 cm Länge wurden daher 3 Wochen hindurch gegen strömendes destilliertes Wasser dialysiert. Zum Vergleich wurde eine zweite Partie von Röhren in einer $^{n}/_{10}$-NaCl-Lösung dieselbe Zeit hindurch aufbewahrt, und eine dritte Partie wurde gleichzeitig trocken, mit Lack verschlossen, gehalten. Nach 4 Wochen wurden Versuche zur Bestimmung des Aciditätsoptimums für die Pepsinwirkung mit diesen drei Serien Röhren ausgeführt. Die Pepsinkonzentration war 0,1 $^{0}/_{0}$, die Temperatur ca. 36°, die Zeit 24 Stunden. Die Resultate, in Millimetern gelöster Eiweißsäule angegeben, waren die folgenden.

---

[1]) Auf anderem Wege ist diese Frage von Wo. Pauli und K. Dukes früher am Institut untersucht und aufgeklärt worden. Die Ergebnisse werden demnächst veröffentlicht.

[2]) Die Eiweißröhren wurden auf die in einer früheren Arbeit (Johanne Christiansen, l. c.) genau beschriebene Weise hergestellt.

Tabelle VII.

	Konzentration freier Salzsäure									
	0 bis 0,005	0,005 bis 0,01	0,01 bis 0,02	0,02 bis 0,03	0,03 bis 0,04	0,04 bis 0,06	0,06 bis 0,08	0,08 bis 0,1	0,1 bis 0,15	0,15 bis 0,2
Eiweißröhren,										
gegen Wasser dialysiert	0,2	3,3	6,8	8,4	10,7	10,8	**11,2**	10,8	—	—
gegen $^n/_{10}$-NaCl dialysiert	1,5	—	5,7	9,9	11,1	12,1	**12,8**	11,5	—	—
trocken aufbewahrt . .	0,5	—	3,9	5,8	9,0	9,4	**10,8**	10,0	8,1	6,3

Die Konzentration freier Salzsäure wurde wie gewöhnlich durch Günzburg-Titration bestimmt; sie erlitt während der Verdauung nur eine sehr geringe Änderung (ca. 0,002); der Unterschied zwischen der Gesamt-Salzsäurekonzentration und der Konzentration freier Salzsäure war durch die Salzsäurebindung des Pepsins bedingt und betrug nur 0,004 n-HCl.

Die Tabelle zeigt, daß für alle drei Serien von Röhren dasselbe Aciditätsoptimum besteht; es findet nämlich in allen drei Fällen die stärkste Verdauung bei einer Acidität statt, die zwischen 0,06 n-HCl und 0,08 n-HCl gelegen ist. Der Salzgehalt scheint also innerhalb unserer Versuchsreihe gar keinen Einfluß auf die Lage des Optimums zu haben[1]).

Um einen unmittelbaren Vergleich mit den viscosimetrischen Pepsinversuchen (Tabelle VI) zu erhalten, wurden die dialysierten Mettschen Röhrchen direkt in die dort untersuchten sechs Säure-Eiweiß-Pepsinlösungen gebracht und in dem Thermostaten 24 Stunden hindurch bei 37° stehen gelassen. Die Resultate waren die folgenden, in Millimetern angegeben.

Tabelle VIII.

0,808 % **Rinderserum.**

	Gesamt-Salzsäurekonz. . . Konz. freier Salzsäure . .	0,006 n 0	0,008 n 0	0,01 n 0	0,016 n 0,004 n	0,022 n 0,010 n	0,035 n 0,023 n
1	0,002 % Pepsin	0	0	0	0,1	0,3	1,5
2	0,1 % "	0,1	0,2	0,3	1,3	2,7	5,8

[1]) Die drei Versuchsserien der Tabelle VII sind in ihrem Verlaufe nicht ganz identisch, da die Versuchstemperatur nicht ganz die gleiche war. Bei einem anderen Versuche, wo Röhren der drei verschiedenen Serien gleichzeitig von der gleichen Pepsinlösung verdaut wurden, zeigte es sich, daß alle drei eine ganz gleiche Verdaulichkeit hatten. Die Verdaulichkeit wird also durch die Dialyse nicht merklich beeinflußt.

Die Tabelle zeigt sehr deutlich den Anstieg der Verdauung mit der steigenden Menge Salzsäure. Von einem Verdauungsoptimum eben beim ersten Auftreten freier Salzsäure, also beim Neutralisationspunkt der basischen Affinitäten des Eiweißes (hier bei 0,012 n-Gesamt-Salzsäure), ist hier keine Spur zu sehen, während wir früher beim nativen Eiweiß gefunden hatten, daß die zu beiden Seiten des Neutralitätspunktes gelegenen und in ihrer Viscosität einander entsprechenden Lösungen (also z. B. derjenigen mit 0,006 n- und 0,035 n-Gesamt-Salzsäure) genau den gleichen peptischen Abbau aufwiesen.

Im ersten Versuch der Tabelle VIII ist genau die gleiche Menge Pepsin wie in den viscosimetrischen Versuchen benutzt worden, und man ersieht aus diesem Vergleich deutlich, wie empfindlich die letztere Methode ist, indem Lösungen, die bei 25° im Laufe von 2 Stunden einen viscosimetrisch deutlich meßbaren Abbau bewirken, selbst in 24 Stunden und bei 37° keine oder nur eine spurweise Verdauung nach Metts Methode erkennen lassen.

Es kann kaum einem Zweifel unterliegen, daß der Unterschied in den mittels beider Methoden erhaltenen Resultate durch den Unterschied des Materials seine Erklärung findet, indem die Lösung koagulierten Eiweißes freier Salzsäure bedarf, die Verdauung genuinen Eiweißes dagegen nicht.

V.

Es war in diesem Zusammenhang von Interesse zu untersuchen, ob auch mittels anderer Methoden dieselben Verhältnisse angezeigt werden. Es ist in einer früheren Arbeit nachgewiesen worden, daß während der Pepsinverdauung freie Salzsäure von den neugebildeten „formoltitrierbaren" Aminogruppen gebunden wird[1]). Es ist also möglich, die Verdauung einfach durch Titrierung mit Günzburgs Reagens als Indicator quantitativ zu verfolgen. Ein solcher Versuch wurde folgendermaßen angestellt:

6 Eiweißlösungen, jede mit 1,212% Serum und 0,125% Pepsin sowie verschiedenen Mengen Salzsäure versetzt, wurden (mit Toluolzusatz) in den Thermostaten bei 37° gestellt. Die

[1]) Johanne Christiansen, l. c.

Menge freier Salzsäure wurde in jeder Lösung vor und nach der Verdauung mittels Titrierung mit $^{n}/_{10}$-NaOH mit Günzburgs Reagens als Indicator bestimmt. (Wenn freie Salzsäure nicht vorhanden war, wurde mit $^{n}/_{10}$-HCl bis zum Erscheinen der Günzburgschen Reaktion titriert.) Die Menge der gebundenen Salzsäure bzw. die Salzsäurebindungsfähigkeit war anfänglich in allen Versuchen die gleiche, nämlich 0,023, und zwar war vom Serum 0,018, vom Pepsin 0,005 gebunden. Im Laufe der Verdauung war eine bedeutende Steigerung dieser Salzsäurebindungsfähigkeit deutlich erkennbar, wie die folgende Tabelle dartut.

Tabelle IX.

1,21% Rinderserum + 0,125% Pepsin + verschiedene Mengen Salzsäure.

		Versuchs-Nr.					
		1	2	3	4	5	6
Gesamt-HCl-Konzentration		0,005	0,012	0,025	0,050	0,075	0,100
Konz. freier HCl bzw. Defizit	vor der Verdauung	–0,018	–0,010	0,002	0,027	0,052	0,077
do.	$1^1/_2$ Tage nach d. Verdauung	–0,021	–0,020	–0,009	0,018	0,042	0,065
do.	14 Tage nach d. Verdauung	–0,029	–0,029	–0,015	0,012	0,038	0,060
Konz. gebundener HCl bzw. Säurebindungsfähigkeit	vor der Verdauung	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023
do.	$1^1/_2$ Tage nach d. Verdauung	0,026	0,032	0,034	0,032	0,033	0,035
do.	14 Tage nach d. Verdauung	0,034	0,041	0,040	0,038	0,037	0,040

Die Tabelle zeigt, daß die Lösungen mit Ausnahme des Versuchs 1 (wo schon anfänglich ein bedeutendes Defizit freier Salzsäure vorhanden war) ungefähr die gleiche Zunahme der gebundenen Salzsäuremenge (bzw. Salzsäurebindungsfähigkeit) erfahren, nämlich ca. 0,009 bis 0,012. Die Methode ist zwar nicht sehr empfindlich, die Resultate können aber doch mit den Mettschen Versuchen der Tabelle VIII verglichen werden. Während in der Tabelle VIII ein beträchtlicher Anstieg der Verdauung von den Aciditäten 0,004 bis 0,023 freie HCl stattfindet, liegt der Unterschied der Verdauung bei den entsprechenden Aciditäten in der Tabelle IX (0,002 und 0,027 n-freie HCl)

innerhalb der Versuchsfehler (der von der Größe 0,002 ist) und geht wohl zufällig sogar in der entgegengesetzten Richtung. In dem Versuch 2, wo anfänglich keine freie Salzsäure vorhanden war, ist der Abbau ebenso groß, wie in den Lösungen mit freier Salzsäure.

Auch bei dieser Methode zeigt es sich also, daß bei der Verdauung von genuinem dialysierten Eiweiß kein merklicher Überschuß von freier Salzsäure nötig ist.

Unsere Titrationsmethode ist aber, wie schon hervorgehoben, nicht sehr empfindlich, und es ist daher nötig, die Lösungen recht lange Zeit in dem Thermostaten stehen zu lassen, wodurch die aus Liebmanns und Johannesens[1]) Untersuchungen bekannte Salzsäureschädigung des Pepsins die Verhältnisse kompliziert, wie man aus dem Vergleich zwischen den Versuchen 1 und 6 der Tabelle ersehen kann. Im Versuch 1 hat die gebundene Salzsäuremenge nach $1\frac{1}{2}$ Tagen nur um 0,003 zugenommen, während sie im Versuch 6 um 0,012 gesteigert ist, in den folgenden $12\frac{1}{2}$ Tagen dagegen nimmt die gebundene Salzsäuremenge im Versuch 1 um 0,008 zu, während sie im Versuch 6 wegen der Salzsäureschädigung des Pepsins nur um 0,005 zunimmt. Dieses Moment spielt bei den kurzdauernden viscosimetrischen Versuchen keine Rolle, und es war daher wünschenswert, auch eine andere Methode benutzen zu können, die in der gleichen Zeit und bei der gleichen Temperatur wie die viscosimetrische Methode verwendbar wäre. Es wurde deshalb versucht, ob nicht die durch Pepsin und Salzsäure bewirkte Acidalbuminbildung des dialysierten Eiweißes sich als quantitative Methode verwerten ließe.

Versetzt man dialysiertes Rinder- oder Pferdeserum mit Salzsäure (z. B. 5 ccm Serum + 5 ccm $^{n}/_{10}$-HCl), so findet nach wenigen Sekunden eine Acidalbuminbildung statt, die man an der bei Neutralisation eintretenden Trübung erkennen kann[2]). Dasselbe tritt bei Benutzung von rohem Hühnereiweiß, vier

---

[1]) P. Liebmann und Johannesen, Ugeskrift for Läger. 1911. Nr. 25.

[2]) Die Trübung scheint bei ein wenig saurer Reaktion (Umschlag des Kongopapiers) größer als bei der ganz neutralen Reaktion (Umschlag des Lackmuspapiers) zu sein, wie es auch von F. Goldschmidt beobachtet wurde (Über die Einwirkung von Säuren auf Eiweißstoffe. Inaug.-Diss. Straßburg 1898).

mal verdünnt, neutralisiert und filtriert, auf. Der Vorgang wird von Pepsin beschleunigt, und es war also möglich, diese Beschleunigung als Maß der Pepsinwirkung zu benutzen. Der Vorgang war aber wegen der schon von der Säure bewirkten Acidalbuminbildung ziemlich kompliziert, und es war daher vorzuziehen, einen Eiweißstoff zu benutzen, der unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht mit Säure allein, sondern nur mit Salzsäure + Pepsin eine Acidalbuminlösung zeigte. Als ein solcher stellte sich das schon für die Titrationsversuche benutzte 2,62 %ige reine Serumalbumin (Hammel) heraus.

Es ist schon aus Hammarstens[1]) und Johanssons[2]) Untersuchungen bekannt, daß Serumalbumin gegen Spaltung durch verdünnte Säuren (in Gegensatz zu Globulin) sehr resistent ist, und es zeigte sich auch bei uns, daß das benutzte Hammelalbumin selbst nach kurzem Kochen mit Salzsäure in den für die zu erwähnenden Pepsinversuche verwendeten Konzentrationen keine Spur einer Acidalbuminbildung erkennen läßt. Bei Zusatz von Pepsin dagegen tritt schon bei Zimmertemperatur nach kurzer Zeit eine deutliche Acidalbuminbildung auf, und zwar in ausgesprochener Abhängigkeit vom Salzsäuregehalt.

Die Versuche wurden folgendermaßen angestellt: In je 12 Eprouvetten wurden 5 ccm Albumin, 1 ccm 0,1 % Pepsin und 0,8, bzw. 1,2, 1,6 usw. ccm $^{n}/_{10}$- (bzw. $^{n}/_{5}$-) HCl und Wasser auf 10 ccm Gesamtvolumen gemischt und zur Verdauung bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 1 Stunde wurden die Lösungen in derselben Reihenfolge neutralisiert, indem die der zugesetzten Säuremenge entsprechende Menge $^{n}/_{10}$- (bzw. $^{n}/_{5}$-) KOH zugesetzt wurde. Bei dieser Neutralisation entstand eine Trübung, die in den verschiedenen Lösungen verschieden stark war. Die relative Stärke dieser Trübung wird in der Tabelle X durch die Anzahl der +-Zeichen angegeben.

Die Tabelle zeigt einen sehr deutlichen Unterschied zwischen den verschiedenen Lösungen. Die Größe der bei der Neutralisation entstehenden Ausfällung steigt schnell bis zur Lösung von der Acidität 0,018 n, wo eben freie Säure auftritt und das

---

[1]) O. Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chem. 8, 466, 1884.
[2]) J. E. Johansson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 9, 310, 1885.

Viscositätsmaximum der Serie liegt; von da an nimmt die Trübung wieder allmählich ab.

Tabelle X.
1,31 % Hammelalbumin + 0,01 % Pepsin + verschiedene Mengen HCl.

Versuchs-Nr.	Gesamt-HCl-Konzentration	Konzentration freier HCl	Grad der Ausfällung bei Neutralisation nach 1 Stunde
1	0	0	klar
2	0,008 n	0	+
3	0,012 „	0	++++
4	0,016 „	0	+++++
5	0,018 „	Spur	+++++
6	0,020 „	0,002 n	+++++
7	0,022 „	0,004 „	+++++
8	0,024 „	0,006 „	+++
9	0,028 „	0,010 „	+++
10	0,030 „	0,012 „	++
11	0,050 „	0,032 „	++
12	0,080 „	0,062 „	+

Anscheinend erreicht demnach die Verdauung gerade im Neutralisationspunkte der basischen Affinitäten des Albumins, wo also die meisten Ionen vorhanden sind, ihr Maximum. Diese Schlußfolgerung ist aber nicht ganz sicher. Variiert man nämlich die Versuchszeit, so zeigt sich, daß die bei Neutralisation angezeigte Acidalbuminmenge (bei 0,01 % Pepsin und einer Temperatur von 15°) nach $^1/_4$ Stunde am größten ist und mit der Zeit wieder langsam abnimmt. Wahrscheinlich werden im Verlaufe der Pepsinwirkung mit der Zeit bei der Neutralisation nicht fällbare fortgeschrittenere Abbauprodukte gebildet.

Es wäre demnach möglich, daß in Tabelle X nur ein scheinbares Optimum vorliegt, das dadurch vorgetäuscht wird, daß die bei den höheren Aciditäten gebildeten Verdauungsprodukte nicht mehr die Eigenschaften des Acidalbumins aufweisen. Gegen diese Auffassung spricht aber die Tatsache, daß die Lage des Ausfällungsmaximums bei verschiedenen Zeiten ganz unverändert bleibt und auch bei sehr schwacher Pepsinkonzentration (0,002 %) und bei einer Versuchszeit von 15 Min. genau auf denselben Aciditätspunkt fällt.

Eine zweite Fehlerquelle bildet die von W. Pauli und seinen Schülern schon öfters untersuchte Neutralsalzwirkung.

Das Neutralsalz hat auf die eben beschriebene Ausfällung des Acidalbumins einen ganz eigentümlichen Einfluß. Versetzt man von vornherein neutrales oder nach Säurezusatz wieder neutralisiertes Serum oder Albumin mit Chlorkalium (in Konzentrationen $< {}^{n}/_{10}$), so findet keine sichtbare Änderung der Lösungen statt; es erfolgt weder Ausfällung, noch Lösung eines eventuell vorhandenen Acidalbuminniederschlags. Wird dagegen Neutralsalz dem mit Säure versetzten Serum oder Albumin zugefügt, so bewirkt die nachfolgende Neutralisation je nach der Salzmenge nur einen geringen oder keinen Niederschlag von Acidalbumin, obgleich die Kontrollösung ohne Salzzusatz eine reichliche Ausfällung zeigt. Es ist dabei gleichgültig, ob das Salz unmittelbar vor der Neutralisation oder mehrere Stunden vorher zugesetzt wurde. Die Wirkung ist somit keine Hemmung der Acidalbuminbildung, sondern besteht nur in einer Hemmung der Fällung des Acidalbumins [Analogie mit der Hemmung der Hitzekoagulation durch gewisse Neutralsalze[1])]. Diese Wirkung zeigt sich sowohl bei der durch Säure allein bewirkten Acidalbuminbildung des dialysierten (globulinhaltigen) Serums (namentlich bei niedrigen Aciditäten, wo noch keine freie Salzsäure vorhanden ist), wie auch bei der durch Säure + Pepsin bewirkten Acidalbuminbildung des reinen Serumalbumins. Es lag nun der Gedanke nahe, daß die eigentümliche Form der Ausfällungskurve bei diesem letzteren Vorgang dadurch zustande kommt, daß die Ausfällung bei den höheren Aciditäten durch das bei der Neutralisation gebildete Neutralsalz gehindert wird. Die in diesem Sinne unternommenen Kontrollversuche (wobei zu den Lösungen mit niedrigerem Salzsäuregehalt vor der Neutralisation Neutralsalz in solcher Menge zugesetzt wurde, daß sie nach der Neutralisation gleiche Konzentration von Neutralsalz wie die damit zu vergleichenden Lösungen höherer Salzsäurekonzentration enthielten) zeigten indessen, daß das angedeutete Verhältnis zwar eine große Rolle spielen, aber bei weitem nicht als die alleinige Ursache des Abfalls der Kurve nach dem Maximum gelten könne. Auffallend ist es ja auch, daß die durch Säure allein bewirkte Acidalbuminbildung des

---

[1]) Pauli und Handovsky, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 425, 1908.

dialysierten Serums[1]) mit zunehmender Säurekonzentration stetig zunimmt, obgleich die Salzwirkung hier in dem gleichen Sinne erfolgt wie bei den Pepsin-Salzsäureversuchen.

Es würde wohl verfrüht sein, aus diesen letzten Versuchen (die aus äußeren Gründen vorläufig eingestellt werden mußten, aber noch nicht abgeschlossen sind) endgültige Schlußfolgerungen in Beziehung auf die Pepsinverdauung abzuleiten. So viel läßt sich aber sicher sagen, daß auch nach ihnen der Ionisierung des Eiweißes durch Säurezusatz für die Bildung der ersten Abbauprodukte eine große und noch nicht genügend berücksichtigte Bedeutung zukommt[2]).

---

[1]) Der Unterschied zwischen dem dialysierten Serum und dem reinen Serumalbumin gegenüber Salzsäure beruht wahrscheinlich darauf, daß das dialysierte Serum neben dem Albumin noch Globulin (die sog. Pseudoglobulinfraktion) enthält (vgl. Hammarsten, l. c.).

[2]) Vgl. Pauli, Arch. f. d. ges. Physiol. **136**, 493 und Fortschr. d. naturw. Forschung **4**, 223.

Zur Theorie des isoelektrischen Punktes.

III. Mitteilung[1]).

Das Wesen der eiweißartigen kolloidalen Lösungen.

Von

Leonor Michaelis.

(Aus dem biologischen Laboratorium des städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 6. November 1912.)

Die hervorstechenden Eigenschaften des isoelektrischen Punktes der Ampholyte begegneten mir zuerst in einer Untersuchung über das Flockungsoptimum des denaturierten Serumalbumins. Angeregt durch diese Beobachtung, daß das Flockungsoptimum und der isoelektrische Punkt des denaturierten Albumins identisch waren, unternahm ich eine weitere Untersuchung, die den Zusammenhang des isoelektrischen Punktes von Aminosäuren mit ihrem Krystallisationsoptimum zum Gegenstande hatten. Weiterhin vervollständigte ich die Theorie des isoelektrischen Punktes durch theoretische Untersuchungen über den Einfluß der Größe der Dissoziationskonstanten der Ampholyten auf die Lage des isoelektrischen Punktes und die Breite der „isoelektrischen Zone". Hiermit glaubte ich diese Untersuchungen vorläufig abgeschlossen zu haben und schloß eine Reihe von Arbeiten an, die diese Theorie zur Grundlage hatten und einen von einigen wenigen Forschern wohl schon vorausgeahnten, aber in exakter Weise noch nicht belegten Aufschluß über das Wesen der Beeinflussung der Wasserstoffionenkonzentration auf die Wirkung der Fermente geben. Neuerdings von L. P. S. Sörensen geäußerte Bedenken gaben mir nun Veranlassung, diese Sache noch weiter zu verfolgen.

---

[1]) Vgl. diese Zeitschr. **30**, 144, 1910; **33**, 182, 1911.

Sörensen[1]) hat kürzlich ein umfassendes Sammelreferat über die Messung und Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei biologischen Prozessen verfaßt, in dem die von mir entwickelten Anschauungen in vielen wesentlichen Punkten gewürdigt und sogar zur Grundlage seiner weiteren Ableitungen gemacht wurden. Es besteht aber noch eine wesentliche Meinungsverschiedenheit zwischen Sörensen und mir, die ich in dieser Arbeit der Klärung näher zu bringen suchen werde.

Sörensen zieht nämlich die von mir behauptete Identität von isoelektrischem Punkt und Löslichkeitsminimum bzw. Flockungsoptimum der Ampholyte in Zweifel. Die folgende Arbeit beschäftigt sich zunächst mit den Kriterien des isoelektrischen Punktes der leicht löslichen Ampholyte, über den experimentelle Daten noch gar nicht vorliegen, sodann mit dem Löslichkeitsminimum der schwerlöslichen Ampholyte, die den Gegenstand der Meinungsverschiedenheit mit Sörensen bilden, und schließlich mit der Theorie des Flockungsoptimums der kolloidalen Ampholyte.

1. Der isoelektrische Punkt der leicht löslichen Ampholyte.

Bringt man einen leicht löslichen Ampholyten in eine Lösung von irgendeiner bestimmten $[H^{\cdot}]$, so verhält er sich wie eine Säure, wenn diese $[H^{\cdot}]$ kleiner als der isoelektrische Punkt ist, und wie eine Base, wenn die $[H^{\cdot}]$ größer als derselbe ist. Mit anderen Worten: im ersten Falle wird der Ampholyt, wie jede Säure, die $[H^{\cdot}]$ vermehren, im zweiten Falle, wie jede Base, dieselbe vermindern. Ist die ursprüngliche $[H^{\cdot}]$ der Lösung gerade gleich dem isoelektrischen Punkt, so wird der zugesetzte Ampholyt die $[H^{\cdot}]$ ungeändert lassen. Für diese Behauptung schien mir ein experimenteller Beleg erwünscht. Er wurde mit Phenylalanin und mit Glykokoll durchgeführt.

Versuche mit Phenylalanin.

Je 0,25 ccm $^{n}/_{10}$-Natriumacetatlösung wurden mit wechselnden Mengen Essigsäure und einerseits Wasser, andererseits Phenylalaninlösung auf ein Volumen von 5 ccm aufgefüllt. Es wurden je 2,5 ccm einer heiß gesättigten Phenylalaninlösung benutzt. Die Lösungen hatten folgende $[H^{\cdot}]$ (bei 18 bis 19°):

---

[1]) Asher und Spiro, Ergebn. d. Physiol. 1912, 506 ff.

	p_H mit Wasser	p_H mit Phenylalanin	Differenz p_H Phenylalanin — p_H Wasser
1.	3,73	4,01	+ 0,28
2.	4,10	4,22	+ 0,12
3.	4,27	4,43	+ 0,16
4.	4,58	4,57	— 0,01
5.	4,66	4,55	— 0,11
6.	5,07	4,78	— 0,29
7.	5,26	4,74	— 0,52
8.	5,45	4,72	— 0,73
9.	5,73	4,77	— 0,96

Wir finden somit, daß der isoelektrische Punkt des Phenylalanins bei etwa $10^{-4,58}$ liegt, mit der Maßgabe, daß $10^{-4,27}$ schon entschieden viel zu groß, und $10^{-4,66}$ entschieden viel zu klein ist. Wenn wir nun aus den Daten von Kanitz[1]) über die beiden Dissoziationskonstanten des Phenylalanins für 25°

$$k_a = 2,5 \cdot 10^{-9},$$
$$k_b = 1,3 \cdot 10^{-12}$$

den isoelektrischen Punkt nach der Formel

$$J = \sqrt{\frac{k_a}{k_b} \cdot k_w}$$

berechnen, so erhalten wir in guter Übereinstimmung damit

$$J = 3,3 \cdot 10^{-5} \quad \text{oder} \quad 10^{-4,48}.$$

Versuche mit Glykokoll.

Es wurde je 1 ccm $^n/_{10}$-Essigsäure mit wechselnden Mengen einer $^n/_1$-Natriumacetatlösung und Wasser auf 20 ccm aufgefüllt, und je 5 ccm dieser Lösung einmal mit 5 ccm Wasser, ein zweites Mal mit 5 ccm einer 2 n-Lösung von Glykokoll versetzt. Die Messungen geschahen im Luftthermostaten bei 25°.

a) p_H mit Wasser	b) p_H mit Glykokoll	Differenz p_H Wasser—p_HGlykokoll
6,62	6,52	+ 0,10
6,31	6,29	+ 0,02
6,02	6,00	+ 0,02
5,73	5,80	— 0,07
5,38	5,56	— 0,18

[1]) Kanitz, Zeitschr. f. physikal. Chem. 47, 476, 1906; Arch. f. d. ges. Physiol. 118, 539, 1907.

Aus den von Winkelblech[1]) bestimmten Werten von k_a und $k_b = 1{,}8 \cdot 10^{-10}$ bzw. $2{,}7 \cdot 10^{-12}$ für 25° und für $k_w = 1 \cdot 10^{-14}$ berechnet sich der isoelektrische Punkt zu $8{,}2 \cdot 10^{-7}$ oder sein Logarithmus zu $-6{,}09$, während ihn die obige Tabelle zwischen 6,29 und 5,80, also, in Anbetracht der Breite der isoelektrischen Zone und der infolgedessen nicht höher zu erwartenden Genauigkeit des Versuchs, übereinstimmend zeigt.

Hiermit ist an zwei Beispielen gezeigt, daß die theoretisch zu fordernde Eigenschaft des isoelektrischen Punktes der leicht löslichen Ampholyte innerhalb der zu erwartenden, allerdings nicht unbedeutenden Fehlergrenzen experimentell bestätigt wird.

2. Der isoelektrische Punkt der schwer löslichen Ampholyte.

L. P. S. Sörensen hat sich meiner Theorie über die Koinzidenz des isoelektrischen Punktes und des Löslichkeitsminimum eines schwer löslichen Ampholyten nicht angeschlossen. Er hat die ihm, wie er meint, aus rein chemischen Gründen näher liegende Theorie aufgestellt, daß ein amphoterer Elektrolyt sein Fällungsoptimum bei derjenigen Wasserstoffionenkonzentration habe, die er, in reiner wässeriger Lösung, der Lösung zuerteilen würde. Ziehen wir nun einmal die Konsequenzen aus diesen beiden Theorien und vergleichen sie mit den wirklichen Befunden. Wir bedienen uns dabei der theoretischen Sätze von Sörensen, die er in überzeugender Weise mathematisch entwickelt hat. Diese sind, soweit sie für uns in Betracht kommen, folgende:

1. Die Eigenreaktion der reinen Ampholytlösung, und damit nach der Sörensenschen Auffassung auch das Fällungsoptimum, ist von der Konzentration des Ampholyten abhängig. Ist diese Konzentration sehr groß, so nähert sich das Fällungsoptimum dem isoelektrischen Punkt, ist dagegen die Konzentration sehr klein, so nähert sich das Fällungsoptimum der neutralen Reaktion des Wassers. Nur zwischen diesen beiden Grenzen kann das Fällungsoptimum variieren.

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 36, 546, 1901.

2. Ein besonderer Fall dieser Konsequenz, der aber eine eigene Hervorhebung verdient, ist folgender: Mit abnehmender Konzentration des Ampholyten entfernt sich das Fällungsoptimum von dem isoelektrischen Punkt immer mehr (wenn nicht zufällig isoelektrischer Punkt und neutrale Reaktion bei dem betreffenden Ampholyten zusammenfallen).

Aus meiner Theorie dagegen würde sich ergeben: Die Wasserstoffionenkonzentration des Fällungsoptimums ist stets gleich der des isoelektrischen Punktes, und

zweitens als Spezialfall: Dieser Satz gilt auch für extrem niedere Konzentrationen des Ampholyten.

Man sollte nun meinen, daß das Experiment eine sichere Entscheidung zwischen den beiden Ansichten geben sollte. Ändert sich das Krystallisationsoptimum mit der Konzentration des Ampholyten, so hat Sörensen recht, ändert es sich nicht, so habe ich recht. Jedoch ist die experimentelle Entscheidung heute noch nicht sicher erbracht worden. Wie nämlich Sörensen berechnet hat, müßte auch nach seiner Auffassung das Krystallisationsoptimum einer einigermaßen hoch konzentrierten Lösung einer Aminosäure so dicht am isoelektrischen Punkte liegen, daß die Differenz des Krystallisationsoptimums und des isoelektrischen Punktes in den Bereich der Fehlergrenzen der Methode fallen würde. Es handelt sich daher zwar nicht um eine tatsächliche, aber doch um eine sehr bedeutsame theoretische Meinungsverschiedenheit. Untersuchen wir nun, auf welche Weise Sörensen zu seiner Anschauung gelangt. Sörensen schreibt über meine Versuche mit Aminosäuren: „Wenn wir die hier erörterten Versuche vom rein chemischen Standpunkte aus betrachten, scheint uns aber eine andere Erklärungsweise viel einfacher, nämlich die, daß das Krystallisationsoptimum bzw. das Löslichkeitsminimum dann zu erwarten wäre, wenn die ganze Aminosäure in der Lösung in freiem Zustande vorhanden ist, d. h. wenn soviel Essigsäure zugesetzt worden ist, daß die gebildete Mischung von Natriumacetat und Essigsäure die gleiche Wasserstoffionenkonzentration hat, wie eine reine wässerige Lösung der Aminosäure von der in Frage stehenden Konzentration.“

Ich kann nicht verhehlen, daß dieser Satz eine mir nicht

zum Verständnis gelangte Unklarheit enthält. Ich würde statt dessen sagen: Das Krystallisationsoptimum einer (übersättigten) Lösung einer Aminosäure liegt bei derjenigen Wasserstoffionenkonzentration, bei der die Lösung in bezug auf die auszukrystallisierende Molekülart am meisten übersättigt ist. Oder: das Löslichkeitsminimum eines amphoteren Elektrolyten liegt bei derjenigen [H˙], bei der in der Lösung neben den (in gesättigter Lösung nach dem Verteilungssatz stets in konstanter Konzentration vorhanden) undissoziierten Aminosäuremolekülen möglichst wenig Ionen der Aminosäure außerdem noch vorhanden sind. Ich wüßte nicht, welchen Einwand man gegen diese Behauptung auch vom „rein chemischen Standpunkt" aus machen könnte. Nun bestehen die Krystalle der Aminosäure ausschließlich oder jedenfalls praktisch so gut wie ausschließlich aus undissoziierter Aminosäure. Dies wird niemand bestreiten wollen. Folglich liegt das Krystallisationsoptimum einer Aminosäurelösung bei derjenigen Wasserstoffionenkonzentration, bei der die Konzentration der undissoziierten Aminosäure (bei gegebener Gesamtmenge der Aminosäure) ein Maximum ist, und das ist der isoelektrische Punkt. Nach Sörensen müßte die Aminosäure in reiner, wässeriger Lösung ein Minimum der Löslichkeit besitzen. Nun löst sich z. B. eine Aminosäure, bei der die Säurenkonstante größer als die Basenkonstante ist, in reinem Wasser zum Teil in undissoziierter Form, zum Teil als H˙-Ionen + Aminosäure-Anionen. Es ist soviel von der Aminosäure in reinem Wasser löslich, bis die Lösung an undissoziierter Aminosäure gesättigt ist. Wenn man nun diese Lösung durch Zufügung eines passenden Acetatgemisches auf die isoelektrische [H˙] bringt, so verwandelt man die Aminosäureanionen zum größten Teil in undissoziierte Moleküle, und die Lösung ist daher jetzt an diesen undissoziierten Aminosäuremolekülen übersättigt. Es fällt der überschüssige Teil der Aminosäure aus, und die Gesamtmenge der gelösten Aminosäure ist daher geringer als bei derjenigen Reaktion, die die Aminosäure allein in der wässerigen Lösung erzeugen würde, ja sie ist geringer als bei irgendeiner von der isoelektrischen abweichenden Wasserstoffionenkonzentration. Ich glaube nicht, daß gegen diese Auffassung ein Einwand möglich ist.

3. Das Flockungsoptimum der kolloidalen Ampholyte.

Es ist natürlich, daß man bei der Übertragung dieser Theorie auf die sog. kolloidalen Ampholyte die nötige Vorsicht walten lassen muß.

Um sich über diese Frage ganz klar zu werden, muß man erörtern, welcher Art die Unterschiede zwischen der Lösung der krystallisierbaren Aminosäure und dem nicht krystallisierenden „kolloidalen" Albumin sind. Haben wir eine übersättigte Lösung der Aminosäure vor uns, so besteht die alsbald einsetzende Ausfällung der Aminosäure darin, daß sich Krystalle derselben abscheiden. Die Menge der sich bildenden Krystallmasse hängt (bei gegebener Gesamtmenge der Aminosäure) von der Wasserstoffionenkonzentration ab, sie ist am größten, wenn die Lösung in bezug auf die auskrystallisierende Molekülgattung, d. h. in bezug auf die undissoziierte Aminosäure, am meisten übersättigt ist, d. h. im isoelektrischen Punkt. Überall aber, wo sich Aminosäure abscheidet, geschieht das in Form von Krystallen, nirgends tritt eine sog. amorphe Ausflockung ein. Die Ursache dafür kann nur die sein, daß die einzelnen aus der Lösung ausgeschiedenen Moleküle der Aminosäure zueinander eine größere Kohäsion haben, als Adhäsion zum Wasser, oder was dasselbe ist, daß die Oberflächenspannung der Lösung an der Grenze gegen die abgeschiedenen Teilchen der Aminosäure auf alle Fälle sehr bedeutend ist. So werden die einzelnen Moleküle der abgeschiedenen Aminosäure infolge der starken Grenzflächenspannung der Mutterlauge bis in das Bereich der molekularen Attraktionssphäre aneinander gepreßt und ordnen sich, gezwungen durch die Form der Moleküle, oder durch die sog. vektoriellen Kräfte, zu Krystallen.

Beim Albumin ist das anders. Die abgeschiedenen Albuminteilchen kommen nicht so dicht aneinander, offenbar weil ihre Adhäsion zum Lösungsmittel gleich oder größer ist, als die Kohäsion der einzelnen Albuminteilchen zueinander; mit anderen Worten, weil die Oberflächenspannung des Lösungsmittels gegen das feste Albuminteilchen klein ist. Einen direkten Beweis für die Kleinheit dieser Oberflächenspannung haben wir in der Tatsache, daß das Hinzukommen einer kleinen elektrischen Ladung diese Oberflächenspannung gleich Null oder sogar negativ macht. Der sichtbare Ausdruck dieser

Tatsache ist die Erscheinung, daß die Albuminteilchen, wenn sie sich in einer von der isoelektrischen Wasserstoffionenkonzentration etwas abweichenden Lösung befinden, viel schwerer zusammenballen, ja daß sie unter Umständen sogar in stabiler oder fast stabiler Form suspendiert bleiben, ohne eigentlich gelöst zu sein, was die starke Opaleszenz und die optische Inhomogenität der Flüssigkeit zeigt. Beim denaturierten Albumin zeichnet sich also der isoelektrische Punkt nicht nur dadurch aus, daß das eigentlich gelöste Albumin in ihm ein Minimum darstellt, sondern daß außerdem die Lösung gegen die abgeschiedene Albuminphase ein entschiedenes Maximum der Oberflächenspannung zeigt, und daher das Albumin am schnellsten zusammenflockt. Aber selbst dieses Maximum der Oberflächenspannung ist nicht groß genug, um die Albuminteilchen zu Krystallen zusammenschießen zu lassen. Hierdurch verstehen wir auch, warum so häufig Schwerkrystallisierbarkeit und Fähigkeit zur Bildung kolloidaler Lösung zusammenfallen[1]).

Hierin, und nur hierin kann man den Unterschied der „kolloidalen Albuminlösung" und der „echten Lösung" einer Aminosäure sehen.

Der Unterschied besteht also darin: Die Grenzflächenspannung eines Albuminteilchens gegen Wasser ist klein und kann durch eine elektrische Ladung sogar ins Negative umschlagen; die Grenzflächenspannung eines Teilchens von Aminosäure ist unter allen Umständen so groß, daß sie selbst bei starker elektrischer Ladung nicht negativ wird.

Nun hat Sörensen aus meinen eigenen Versuchen nachzuweisen versucht, daß das Fällungsoptimum mit dem isoelektrischen Punkt nicht genau zusammenfalle. Nur für das denaturierte Albumin läßt er die Koinzidenz gelten, glaubt aber, daß das mit der Art dieses Körpers als Suspensionskolloid zusammenhängt. Aus meinen Versuchen am Casein und Globulin schließt er aber, daß der isoelektrische Punkt mit dem Flockungsoptimum nicht zusammenfalle. Nun ist aber hier folgendes zu

[1]) Natürlich wird auch die Größe der „vektoriellen Kräfte" bei verschiedenen Substanzen verschieden sein, und das Krystallisationsbestreben hängt sowohl von der Größe dieser Kräfte wie von der Größe der Grenzflächenspannung ab.

bedenken. Die wirklich genaue Bestimmung des isoelektrischen Punktes ist äußerst mühevoll und nur durch sehr große Versuchsreihen zu erhalten. Früher hätte ich nicht geglaubt, daß eine wirklich genaue Bestimmung des isoelektrischen Punktes durch den Kataphoreseversuch überhaupt möglich sei. Nach langer Erfahrung ist es gelungen, die Methode so zu verfeinern, daß man sagen kann, der isoelektrische Punkt ist durch Kataphorese soweit definiert, daß sein Logarithmus bis auf weniger als $\pm$ 0,15 festgelegt werden kann. Diese Untersuchungen sind aber mit der so definierten Genauigkeit bisher nur am genuinen Hämoglobin und am denaturierten Serumalbumin, sowie an der Gelatine durchgefürt worden. Von diesen drei Stoffen kommen Hämoglobin und Gelatine nicht in Betracht, weil sie keine Flockung im isoelektrischen Punkt zeigen. Es bleibt nur das denaturierte Albumin. Und bei diesem gibt auch Sörensen die Koinzidenz von isoelektrischem Punkt und Flockungsoptimum auf Grund meiner Versuche zu. Die Untersuchungen am Casein und Globulin sind noch aus der Zeit, wo ich mich mit einer viel gröberen Annäherung begnügen mußte. Sie waren mir auch damals ausreichend, um zu zeigen, daß kein Widerspruch mit der Theorie besteht; nach den Sörensenschen Einwendungen dürften sie aber nicht mehr ausreichen, weder in meinem, noch im Sörensenschen Sinne verwendet zu werden. Ich werde auf die experimentelle Feststellung des isoelektrischen Punktes des Caseins in der folgenden Arbeit zurückkommen und auch hier beweisen, daß eine praktisch vollkommene Übereinstimmung des Fällungsoptimum mit dem isoelektrischen Punkt besteht.

Was nun die soeben entwickelte Theorie über das Wesen der „kolloidalen“ Albuminlösungen betrifft, so kann ich natürlich zurzeit nicht beweisen, daß der von mir herangezogene Unterschied der Grenzflächenspannung der einzige Unterschied einer kolloidalen Albuminlösung gegen die Lösung einer krystallisierenden Aminosäure ist. Es ist aber zurzeit, soweit ich überblicken kann, keine Tatsache bekannt, die noch andere Annahmen über diesen Unterschied nötig machte, und man muß versuchen, solange mit dieser einfachen Theorie auszukommen, als nicht zwingende Gründe weitere Hypothesen nötig machen.

Zusammenfassung.

Der Einwand von Sörensen gegen die Theorie über die Koinzidenz von Fällungsoptimum und isoelektrischem Punkt wird erörtert. Ferner wird versucht, alle Besonderheiten der sog. „kolloidalen Lösungen" eiweißartiger Körper darauf zurückzuführen, daß die Grenzflächenspannung der festen Eiweißteilchen gegen die gesättigte wässerige (echte) Lösung derselben kleiner ist, als dies bei gut krystallisierenden Körpern der Fall ist. Dies hat zur Folge: Neigung zur Dispergierung und Suspendierung der festen Phase beim Hinzutreten eines elektrischen Potentials, sowie Abneigung gegen die Krystallisation.

Der isoelektrische Punkt des Caseins.

Von

L. Michaelis und H. Pechstein.

(Aus dem biologischen Laboratorium des städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 6. November 1912.)

Aus theoretischen Gründen ließ sich erwarten, daß das Flockungsoptimum vieler Kolloide mit dem isoelektrischen Punkte derselben zusammenfällt. Mit einer allen Ansprüchen genügenden Genauigkeit ist diese Tatsache bisher nur beim denaturierten Serumalbumin bestätigt worden. Da Sörensen nun aber neuerdings die theoretische Grundlage dieses Lehrsatzes in Zweifel gezogen hat, so war eine Erweiterung des experimentellen Materials an einem weiteren Beispiel erwünscht. Wir wählten dazu das Casein, und zwar gerade aus dem Grunde, weil Sörensen aus unseren eigenen Versuchen am Casein entnommen zu haben glaubt, daß das Flockungsoptimum und der isoelektrische Punkt nicht übereinstimmen.

Obwohl es sehr einfach ist, die rohen, orientierenden Versuche an dem gut flockenden Casein auszuführen, so bietet doch gerade für die feinere quantitative Ausgestaltung das Casein eine Schwierigkeit.

Eine einfache Übertragung unserer früheren Versuchsanordnung genügte hier nicht, was seinen Grund darin hat, daß der Einfluß der Neutralsalze beim Serumalbumin ein anderer ist als beim Casein. Beim Serumalbumin bestand nämlich die Erscheinung, daß Zusatz von Neutralsalzen keinen Einfluß auf die Lage des isoelektrischen Punktes und des Flockungsoptimums

hatte, daß dagegen die Flockungsgeschwindigkeit durch Neutralsalze stark gehemmt wurde. In diesen durch Salz an der Flockung gehemmten, aber trüben Lösungen ließen sich nun elektrische Überführungsversuche leicht ausführen, und so wurde eine ziemlich genaue Bestimmung des isoelektrischen Punktes ermöglicht.

Auf das Casein wirken Neutralsalze etwas anders. Zwar wird durch dieselben die Lage des Flockungsoptimums ebensowenig verschoben wie beim Albumin, aber die Kräftigkeit der Flockung wird, im Gegenteil, vergrößert. Dazu tritt dann noch eine andere Erscheinung, die wir zunächst kurz als Asymmetrie der Reihe bezeichnen wollen. Es erwies sich deshalb beim Casein gerade umgekehrt als vorteilhaft, Überführungsversuche in möglichst salzarmen Lösungen zu machen und wenigstens in der Umgebung des isoelektrischen Punktes mit äußerst verdünnten Caseinlösungen zu arbeiten, so daß die Caseinflockung sich nur als eine ganz feine, kaum sedimentierende Trübung äußerte, deren Wanderung im Stromfeld direkt beobachtet werden konnte.

1. Das Fällungsoptimum des Caseins bei verschiedenem Salzgehalt der Lösung.

In Caseinlösungen von genügender Verdünnung läßt sich bei niedrigem Salzgehalt das Flockungsoptimum ebenso scharf bestimmen wie beim denaturierten Serumalbumin, und die Reproduzierbarkeit dieser Versuche ist eine sehr gute.

In Tabelle I ist das Schema eines solchen Flockungsversuches angeführt. Da sich aus früheren Versuchen die Flockungsgeschwindigkeit als eine eindeutige, aber nicht alleinige Funktion des H-Ionengehaltes erwiesen hatte, ist in allen Röhrchen jeder einzelnen Reihe der Casein- und Salzgehalt derselbe. Als Stammlösung wählten wir eine 0,2 $^0/_0$ige Caseinlösung in $^n/_{20}$-Natriumacetat. Hiervon wurde jedes Röhrchen mit je 1 ccm beschickt und eine $^n/_{20}$-Essigsäure in steigender Menge in der Weise hinzugefügt, daß jedes vorangehende Glied das 0,7 fache an Essigsäure im Vergleich zu dem folgenden enthielt. Jedes einzelne Röhrchen wurde mit Wasser auf 10 ccm aufgefüllt, so daß wir es bei unseren Versuchen zuletzt mit einer 0,02 $^0/_0$igen Caseinlösung und $^n/_{200}$-Acetat zu tun hatten.

Tabelle I.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0,2 % iges Casein, in n/20-Acetat .	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
H_2O	8,76	8,66	8,51	8,3	8,0	7,57	6,96	6,09	4,84	3,06	0,51	—[1]
n/20-Essigsäure . .	0,24	0,34	0,49	0,7	1,0	1,43	2,04	2,91	4,16	5,94	8,49	12,13
Sofort	(+)	+	2 +	4 +	4 +	4 +	3 +	3 +	2 +	+	(+)	0
Nach 10 Minuten	(+)	+	2 +	4 +	×	×	4 +	4 +	2 +	+	+	0
„ 25 „	(+)	+	3 +	×	2 ×	2 ×	×	(×)	2 +	+	+	0
„ 24 Stunden	(+)	+	4 ×	4 ×	4 ×	4 ×	4 ×	4 ×	2 +	2 +	+	0

In der Tabelle bedeutet das +-Zeichen Trübung, die Zahl davor die Stärke derselben, das ×-Zeichen Flockung, 4 × bedeutet, daß das Casein völlig ausgeflockt und die darüber befindliche Flüssigkeit wasserklar ist. Erwähnt sei noch, daß der Zusatz der Essigsäure zuletzt erfolgte, da das Casein in verdünnterer Lösung viel weniger leicht ausflockt. Ferner wurde sofort kräftig durchgeschüttelt, damit die Säure nicht im oberen Teile des Röhrchens zunächst konzentrierter blieb und ev. eine irreversible oder doch nur sehr langsam reversible Trübung resp. Flockung erzeugte. Wurde z. B. das Röhrchen 11 mit n/20-Essigsäure versetzt, so trat eine leichte Trübung ein. Es blieb jedoch klar, wenn es mit der äquivalenten Menge n-Essigsäure und selbstverständlich der dazugehörenden Wassermenge beschickt wurde.

Der Anblick einer solchen Reihe ist ein durchaus normaler. D. h. wenn man die Reihe in geometrischer Folge nach $H^{\cdot}$-Konzentrationen ordnet, so finden wir ein bis zwei Röhrchen, die ein Optimum darstellen, bei denen die Flockung am schnellsten und gröbsten auftritt. In symmetrischer Anordnung rechts und links von diesen Röhrchen wird die Flockung weniger energisch, und es bilden sich schließlich nur noch opalescente und dann klare Lösungen. Wenn wir diejenige Zone noch besonders herausgreifen wollen, bei der sich überhaupt noch (d. h. nach 1 bis 2 Tagen) ein sich absetzender Niederschlag herausbildet, so umspannt diese Zone für den gewählten Casein- und Salz-

[1] Das letzte Röhrchen und ev. noch folgende wurden mit n-Essigsäure und der entsprechenden Menge Wasser angesetzt, da das Gesamtvolumen 10 ccm nicht übersteigen durfte.

gehalt die H-Ionenkonzentration von $0{,}98 \cdot 10^{-5}$ bis $5{,}82 \cdot 10^{-5}$. Auf diese Zone werden wir später noch einmal zurückkommen. Bei genauerer Betrachtung der Reihe fällt schon auf, daß die Symmetrie rechts und links vom isoelektrischen Punkte doch keine absolute ist, da die Trübungen nach rechts zu allmählicher abnehmen als nach links. Jedoch ist die Asymmetrie unbedeutend und würde nicht weiter interessieren, wenn diese Erscheinung sich nicht bei höherem Salzgehalte verstärkte. Da wir nämlich vermuteten, daß diese Asymmetrie eine Salzwirkung sei, so stellten wir weitere Versuche mit höheren Salzkonzentrationen an. In Tabelle II sind die einzelnen Versuche zusammengestellt, und zwar ist jedesmal derjenige Augenblick eingetragen, bei dem in einem oder mehreren Röhrchen gleichzeitig die erste Flockenbildung auftrat. Tabelle III zeigt uns die Flockungszone nach 24 Stunden.

Betrachten wir die Versuche mit höherem Salzgehalt, so sehen wir zunächst wiederum die Ausbildung eines scharfen Koagulationsoptimums, aber das Gebiet der 24 stündigen Flockung erstreckt sich nach rechts zu weiter als in der salzarmen Reihe, nach links zu dagegen stimmt es mit dem salzarmen Versuche überein und ist schließlich sogar ein wenig verkürzt. Diese Asymmetrie prägt sich mit steigendem Salzgehalt immer mehr aus. Solange aber überhaupt noch ein Optimum der Flockung erkennbar ist, bleibt dieses ganz oder fast ganz ungeändert gegenüber dem salzarmen Versuche. Die ganze Salzwirkung besteht danach im wesentlichen darin, daß sie die Reihe asymmetrisch macht. Eine Erklärung können wir für dieses Verhalten noch nicht geben. Jedenfalls wird die Theorie des Flockungsoptimums gegen unsere frühere nicht verändert, sobald wir nur salzarme Lösung in Betracht ziehen, und wir müssen nur noch konstatieren, daß bei höherem Salzgehalt eine Erscheinung hinzukommt, die wir theoretisch noch nicht beherrschen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die ganz geringe Asymmetrie auch der salzärmsten Reihen schon auf einer beginnenden Salzwirkung beruht. Wir erinnern nur noch daran, daß eine ähnliche Erscheinung der Asymmetrie von uns auch schon für das Serumalbumin konstatiert wurde, ohne daß wir damals schon den Zusammenhang mit dem Salzgehalt der Lösung erkannten.

Tabelle II.

Flockungsoptimum des Caseins bei verschiedenem Salzgehalt. Beginn der Flockung.

Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	Essigsäure zu Natriumacetat wie n : 1; n =	0,2	0,24	0,34	0,49	0,7	1,0	1,43	2,04	2,91	4,16	5,94	8,49	12,13	17,33	24,76	35,37
1	0,02 %iges Casein, $^n/_{200}$-Acetat	0	(+)	+	2+	4+	×	×	4+	4+	2+	+	(+)	0	—	—	—
2	do.	0	(+)	+	4+	4+	×	×	4+	3+	2+	2+	+	0	—	—	—
3	do.	—	—	(+)	+	3+	3+	×	3+	2+	+	(+)	—	—	—	—	—
4	do.	—	—	+	2+	3+	×	×	3+	2+	+	+	—	—	—	—	—
5	0,02 %iges Casein, $^n/_{50}$-Acetat	—	0	(+)	2+	3+	×	3+	2+	+	(+)	(+)	0	0	—	—	—
6	0,02 %iges Casein, $^n/_{10}$-Acetat	—	0	+	2+	4+	2×	×	×	×	(×)	(×)	2+	0	—	—	—
7	0,02 %iges Cas., $^n/_{50}$-Acet., $^n/_{100}$-NaCl	—	—	(+)	+	3+	×	3+	3+	2+	+	+	0	0	0	—	—
8	0,02 %iges Cas., $^n/_{50}$-Acet., $^n/_{10}$-NaCl	0	0	+	2+	3+	2×	×	×	×	(×)	3+	3+	2+	+	0	0
9	do.	0	0	(+)	+	2+	×	×	×	×	×	(×)	2+	+	(+)	0	0

Tabelle III.

Ausflockungszone bei verschiedenem Salzgehalt und 24 stündigem Stehen.

Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	Essigsäure zu Natriumacetat wie n : 1; n =	0,2	0,24	0,34	0,49	0,7	1,0	1,43	2,04	2,91	4,16	5,94	8,49	12,13	17,33	24,76	35,37
1	0,02 %iges Casein, $^n/_{200}$-Acetat	0	(+)	+	4×	4×	4×	4×	4×	4×	2+	2+	+	0	—	—	—
2	do.	0	(+)	+	4×	4×	4×	4×	4×	4×	2+	2+	+	0	—	—	—
3	do.	—	—	(+)	4×	4×	4×	4×	4×	4×	+	+	—	—	—	—	—
4	do.	—	—	+	4×	4×	4×	4×	4×	3×	+	+	—	—	—	—	—
5	0,01 %iges Casein, $^n/_{400}$-Acetat	—	—	0	2×	2×	2×	2×	2×	2×	+	0	0	—	—	—	—
6	0,02 %iges Casein, $^n/_{50}$-Acetat	—	0	(+)	4×	4×	4×	4×	4×	4×	2+	+	(+)	0	—	—	—
7	0,02 %iges Casein, $^n/_{10}$-Acetat	—	0	+	2+	4×	4×	4×	4×	4×	4×	4×	2+	(+)	—	—	—
8	0,02 %iges Cas., $^n/_{50}$-Acet., $^n/_{100}$-NaCl	—	—	(+)	4×	4×	4×	4×	4×	4×	+	+	0	0	0	—	—
9	0,02 %iges Cas., $^n/_{50}$-Acet., $^n/_{10}$-NaCl	0	0	(+)	+	2+	4×	4×	4×	4×	4×	4×	3×	+	(+)	0	0
10	do.	0	0	+	2+	3+	4×	4×	4×	4×	4×	4×	4×	2+	+	0	0

Bestimmen wir nun das Flockungsoptimum nach der H-Ionenkonzentration, indem wir diese einerseits nach der Formel $H = \frac{1{,}86 \cdot 10^{-5}}{\alpha} \cdot \frac{\text{Essigsäure}}{\text{Acetat}}$ berechnen, andererseits die tatsächliche Konzentration mit der Gaskettenmethode in den betreffenden Röhrchen messen, so finden wir die in Tabelle IV zusammengestellten Werte. Für α wurden dabei folgende Werte angenommen:

$\frac{n}{10}$ 0,79

$\frac{n}{50}$ 0,87

$\frac{n}{200}$ . . . . 0,93.

Tabelle IV.

H˙-Konzentration der Flockungsoptima.

Nr. des Versuchs	[H] gemessen[1])	[H] berechnet
1	$2{,}3 \cdot 10^{-5}$	$2{,}4 \cdot 10^{-5}$
2	$2{,}2 \cdot 10^{-5}$	$2{,}4 \cdot 10^{-5}$
3	$2{,}8 \cdot 10^{-5}$	$2{,}9 \cdot 10^{-5}$
5	$2{,}0 \cdot 10^{-5}$	$2{,}1 \cdot 10^{-5}$
6	$2{,}5 \cdot 10^{-5}$	$2{,}4 \cdot 10^{-5}$
7	$2{,}5 \cdot 10^{-5}$	— [2])
8	$2{,}8 \cdot 10^{-5}$	—

Wir sehen also die gemessenen und berechneten Werte in guter Übereinstimmung, und zwar ergibt sich als Mittel für das Flockungsoptimum aus den gemessenen Zahlen der Wert:

$$[H^{\cdot}] = 2{,}4 \cdot 10^{-5}.$$

2. Die Überführungsversuche mit Casein.

Die Überführungsversuche wurden technisch genau so wie früher ausgeführt. Zur Vermeidung des Salzeinflusses wurde

---

[1]) In den Fällen, in denen bei zwei Röhrchen die Flockung zu gleicher Zeit und mit gleicher Intensität auftrat, ist das geometrische Mittel zwischen den beiden gemessenen H-Ionenkonzentrationen als Optimum angeführt.

[2]) Für die Versuche 7 und 8 wurde [H] nicht berechnet, da der Wert von α infolge des NaCl-Zusatzes nicht genau genug bekannt war.

aber stets in sehr salzarmer Lösung, im Maximum bei einem Salzgehalt von $^{n}/_{100}$-Acetat gearbeitet. Das Casein, in dem zu untersuchenden Elektrolytgemisch gelöst, befand sich in einem Mittelgefäß, an das sich beiderseits ein Seitengefäß, gefüllt mit demselben Elektrolytgemisch ohne Casein, anschloß. Die Elektroden tauchten in aufgesetzte Endgefäße ein, und zwar wurde wieder als Kathode Kupfer in Kupferchlorid, als Anode Silber in Kochsalz benutzt.

Der Nachweis der Wanderung wurde durch direkte Beobachtung der Verschiebung des opalescierenden Flüssigkeit erbracht und zweitens noch dadurch, daß nach Abschluß der Versuche in den Seitengefäßen das Casein durch Sulfosalicylsäure nachgewiesen wurde. Es ließ sich überall da, wo eine Wanderung der trüben Flüssigkeit beobachtet wurde, durch Sulfosalicylsäure noch eine erhebliche Verstärkung der Trübung erreichen, d. h. stets haben die gröberen, ungelösten, schwebenden Caseinteilchen dieselbe Wanderungsrichtung wie die neben ihnen befindlichen Caseinionen. Die Dauer der einzelnen Versuche war schwankend, $^{1}/_{4}$ bis 2 Stunden, indem der Versuch abgebrochen wurde, sobald die Verschiebung der opalescierenden Flüssigkeit deutlich war. Bei dieser kurzen Versuchsdauer trat niemals, wie Tabelle V zeigt, eine Änderung der $H^{\cdot}$-Konzentration durch den elektrischen Strom ein. Da durch Wärmeströmung oder andere mechanische Ursachen leicht ein Übertritt der Caseinlösung in die Seitengefäße möglich war, so wurden einige Versuche, in denen eine diffuse Nebelbildung in den Seitengefäßen auftrat, verworfen, und nur, wenn die opalescierende Flüssigkeit scharf horizontal begrenzt in das eine Seitengefäß gewandert war, und gleichzeitig sich das Mittelgefäß, ebenso scharf begrenzt, am anderen Ende aufgehellt hatte, der Versuch als gelungen gezählt. In weiterer Entfernung vom isoelektrischen Punkt benutzten wir eine 0,2 $^{0}/_{0}$ ige Caseinlösung in $^{n}/_{100}$-Acetat, konnten damit aber den isoelektrischen Punkt nur bis zu den Werten $1{,}1 \cdot 10^{-4}$ und $7{,}9 \cdot 10^{-6}$ einengen. In näherer Umgebung flockte das Casein zu schnell und zu grob aus. Hier gelangten wir zum Ziel, indem wir zunächst den Caseingehalt auf 0,02 $^{0}/_{0}$ erniedrigten, wodurch die Sedimentierung des Niederschlages verzögert wurde, und indem wir gleichzeitig allmählich bis zu

einem Salzgehalt von $^n/_{400}$ heruntergingen[1]). Was die Herstellung der Eiweißlösung anbetrifft, so hatte sich folgendes als zweckmäßig erwiesen, um eine möglichst nur opalescierende und nicht gleich flockende Lösung zu erhalten. Wir gingen von einer 2$^0/_0$igen Caseinlösung in $^n/_{10}$-Acetat, später 0,2$^0/_0$ in $^n/_{20}$- bis $^n/_{40}$-Acetat aus, nahmen hiervon 10 ccm, füllten diese nicht ganz bis 100 auf und setzten dann erst die Essigsäure tropfenweise unter beständigem Rühren hinzu.

Das Resultat dieser Versuche gibt die folgende Tabelle.

Tabelle V.

Nr.	Prozentgehalt an Casein und n-Salzgehalt	Anode	Kathode	[H]-Konzentration gemessen				[H]-Konzentration berechnet
				vor dem Versuch		nach dem Versuch		
				Seite	Mitte	Seite	Mitte	
1	2$^0/_{00}$ $^n/_{100}$	—	+	$2{,}14 \cdot 10^{-4}$	$2{,}04 \cdot 10^{-4}$	—	$2{,}34 \cdot 10^{-4}$	$2{,}07 \cdot 10^{-4}$
2	2$^0/_{00}$ $^n/_{100}$	—	+	$1{,}02 \cdot 10^{-4}$	$1{,}1 \cdot 10^{-4}$	$1{,}1 \cdot 10^{-4}$	a) 1,05 b) 1,1 } $\cdot 10^{-4}$	$1{,}03 \cdot 10^{-4}$
3	0,2$^0/_{00}$ $^n/_{200}$	—	+	—	—	—	$8{,}13 \cdot 10^{-5}$	$8{,}0 \cdot 10^{-5}$
4	0,2$^0/_{00}$ $^n/_{200}$	—	+	—	—	—	$6{,}61 \cdot 10^{-5}$	$6{,}0 \cdot 10^{-5}$
5	0,2$^0/_{00}$ $^n/_{400}$	—	(+)	$4{,}79 \cdot 10^{-5}$	—	—	$4{,}9 \cdot 10^{-5}$	$4{,}84 \cdot 10^{-5}$
6	0,2$^0/_{00}$ $^n/_{400}$	—	—	$4{,}17 \cdot 10^{-5}$	—	—	$4{,}07 \cdot 10^{-5}$	$3{,}92 \cdot 10^{-5}$
7	0,2$^0/_{00}$ $^n/_{400}$	(+)	—	$1{,}29 \cdot 10^{-5}$	—	—	$1{,}29 \cdot 10^{-5}$	$1{,}37 \cdot 10^{-5}$
8	0,2$^0/_{00}$ $^n/_{400}$	+	—	$1{,}1 \cdot 10^{-5}$	$1{,}2 \cdot 10^{-5}$	—	$1{,}1 \cdot 10^{-5}$	$1{,}17 \cdot 10^{-5}$
9	0,2$^0/_{00}$ $^n/_{100}$	+	—	$1{,}07 \cdot 10^{-5}$	$9{,}55 \cdot 10^{-6}$	—	$9{,}12 \cdot 10^{-6}$	$1{,}0 \cdot 10^{-5}$
10	2$^0/_{00}$ $^n/_{100}$	+	—	—	$7{,}76 \cdot 10^{-6}$	—	$7{,}94 \cdot 10^{-6}$	$8{,}0 \cdot 10^{-6}$
11	2$^0/_{00}$ $^n/_{100}$	+	—	$4{,}37 \cdot 10^{-6}$	$4{,}68 \cdot 10^{-6}$	—	$4{,}68 \cdot 10^{-6}$	$4{,}13 \cdot 10^{-6}$

Wir sehen also, daß die Zone unbestimmter Wanderung zwischen den H˙-Konzentrationen von $4{,}9 \cdot 10^{-5}$ und $1{,}29 \cdot 10^{-5}$ eingeengt werden kann, in dem Sinne, daß die beiden genannten Grenzwerte nur noch spurweise, aber nicht mehr mit voller Sicherheit eine Wanderung zeigten. Dieses Gebiet entspricht aber dem der 24stündigen Flockung ($5{,}82 \cdot 10^{-5}$ bis $0{,}98 \cdot 10^{-5}$),

[1]) Über den Einfluß der Neutralsalze auf die Flockung sei hier noch folgendes bemerkt: Prüft man die Flockungsgeschwindigkeit im isoelektrischen Punkt bei verschiedenem Salzgehalte, so flocken salzarme Lösungen früher, doch ist die Zwischenflüssigkeit opalescent; man konnte sie also bei den Überführungsversuchen wandern sehen. Bei starkem Salzgehalt tritt die Flockung zwar etwas später ein, und diese Hemmung gleicht der beim denaturierten Albumin beschriebenen, später aber wird sie bei Salzgegenwart um so energischer und gröber, so daß die Zwischenflüssigkeit schnell wasserklar wird. Außerdem ist die Zone der Flockung eine breitere, wie die Tabellen zeigen.

ist sogar noch etwas enger. Nehmen wir das geometrische Mittel als wahrscheinlichsten isoelektrischen Punkt, so finden wir $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ in befriedigender Übereinstimmung mit dem Flockungsoptimum von $2{,}4 \cdot 10^{-5}$. Die Übereinstimmung kann wohl genauer nicht verlangt werden. Dies ist hier um so bedeutungsvoller, als wir mit extrem verdünnten Caseinlösungen arbeiteten und man aus der Sörensenschen Theorie zu dem Schluß gezwungen wäre, daß das Flockungsoptimum schon deutlich verschieden vom isoelektrischen Punkt sein müßte. Die Caseinlösungen sind, was ihre molare Konzentration anbetrifft, zweifellos so stark verdünnt, daß man nach Sörensen das Flockungsoptimum nicht weit vom Neutralpunkt des Wassers hätte vermuten müssen. Gerade dieses Beispiel bestätigt aber besonders treffend, daß der isoelektrische Punkt und das Flockungsoptimum zusammenfallen.

Zusammenfassung.

Durch entsprechende Modifikation der Technik gelingt eine ziemlich scharfe Bestimmung des isoelektrischen Punktes des Caseins durch Überführung, $= 2{,}5 \cdot 10^{-5}$, welches sich mit dem Flockungsoptimum $2{,}4 \cdot 10^{-5}$ deckt. Es wird eine eigentümliche Wirkung der Salze, die Asymmetrie der Flockungsreihe, beschrieben.

Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide. XIV.

Die Hydratation verschiedener Eiweißverbindungen mit besonderer Berücksichtigung der Coffeineinwirkung.

Von

Wolfgang Pauli und Oskar Falek.

(Aus der physikalisch-chemischen Abteilung der Biologischen Versuchsanstalt in Wien.)

(Eingegangen am 6. November 1912.)

Mit 8 Figuren im Text.

Die Eiweißkörper werden allgemein zu jener Klasse von Kolloiden gerechnet, die durch ihre hohe innere Reibung und ihre Neigung unter Umständen in Form von Gallerten aufzutreten als lyophile Kolloide charakterisiert sind, da diese Eigenschaften als zuverlässige Kennzeichen innigerer Beziehungen zwischen Dispersionsmittel und dispersen Teilchen aufgefaßt werden. Diese innigeren Beziehungen der zwei Phasen eines dispersen Systems entsprechen im wesentlichen der Hydratation oder allgemeiner Solvation der gelösten Teilchen, deren allgemeine Verbreitung bei dem Prozeß der Lösung überhaupt durch die neueren Arbeiten immer mehr in den Vordergrund tritt. Zugleich aber sind die Eiweißkörper als Komplexe von Aminosäuren amphotere Elektrolyte, also Substanzen, die sowohl mit Säuren als auch mit Basen unter Bildung ionischer Teilchen reagieren können. Die Untersuchungen der letzten Jahre haben nun gezeigt, daß für den Hydratationszustand der Eiweißteilchen in hohem Grade die elektrische Ladung derselben bestimmend ist[1]). Ionische Eiweiß-

[1]) Literatur bei Pauli, Fortschr. d. naturw. Forschung 4, 223, 1912.

teilchen erscheinen durch einen bedeutend höheren Grad der Hydratation ausgezeichnet als neutrale. Zu diesem allgemeinen Unterschied zwischen ionischem und neutralem Eiweiß kommen nun eine Reihe individueller, je nach der Art der vorliegenden Eiweißionen und der zugehörigen neutralen Komplexe. Es hat nämlich die eingehendere Prüfung der Beziehungen zwischen Eiweißkörpern und Elektrolyten gelehrt, daß hier eine große Reihe von komplexen Verbindungen möglich ist, deren Mannigfaltigkeit schon nach dem Stande unserer gegenwärtigen Kenntnisse nicht leicht zu übersehen ist. Dennoch lassen sich wie es scheint die hier auftretenden Verbindungen vorläufig auf eine verhältnismäßig beschränkte Anzahl von Typen reduzieren.

Eine von Elektrolyten sorgfältig gereinigte Albuminlösung stellt hier den einfachsten Fall vor, da sie in physikalisch-chemischer Hinsicht auf den Typus einer einfachen Monoaminosäure vielfach zurückgeführt werden kann. Da aus einer Reihe, unter verschiedenen Gesichtspunkten durchgeführter Untersuchungen, das Überwiegen des sauren Charakters über den basischen für das Albumin mit Sicherheit gefolgert werden kann, so darf für viele Fälle seine Dissoziation ohne großen Fehler als die einer schwachen Säure betrachtet und durch folgendes Schema ausgedrückt werden.

$$R\begin{matrix}\diagup NH_2 \\ \diagdown COOH\end{matrix} \rightleftarrows R\begin{matrix}\diagup NH_2 \\ \diagdown COO\end{matrix} + H.$$

In diesem findet sich auf der linken Seite der Gleichung der neutrale Komplex, auf der rechten der ionische. Außer diesen dem einfachen Aminosäuretypus entsprechenden Molekülarten sind nach den bisherigen Arbeiten noch folgende sichergestellt:

1. Das Salzeiweiß

$$\text{a)}\quad R\begin{matrix}\diagup NH_2H.S \\ \diagdown COO.Me\end{matrix} \quad \text{oder b)}\quad R\begin{matrix}\diagup NH_2MeS \\ \diagdown COOH\end{matrix}$$

2. Das Säureeiweiß

$$R\begin{matrix}\diagup NH_2HS \\ \diagdown COOH\end{matrix}.$$

3. Das Alkalieiweiß

$$R\left\langle\begin{matrix}NH_2\\COOMe\end{matrix}\right. .$$

4. Die Kombination Alkalieiweiß plus Neutralsalz

$$R\left\langle\begin{matrix}NH_2MeS\\COOMe\end{matrix}\right. .$$

5. Die Kombination Säureeiweiß plus Neutralsalz, die möglicherweise mit 1a identisch ist. Doch bedarf es da noch weiterer Untersuchungen[1]).

6. Die Komplexe, die bei der Reaktion von Schwermetallsalzen mit Eiweiß gebildet werden und die, wie neuere Untersuchungen von Pauli und Flecker[2]) dartun, je nach der Menge des vorhandenen Schwermetallsalzes nach dem Typus 3 oder 4 gebaut sein können.

Alle diese Eiweißelektrolytverbindungen sind nun in der Lage, mehr oder minder zu ionisieren und die Ionen werden im einzelnen Falle entsprechend verschieden aufgebaut sein. Im allgemeinen hat sich gezeigt, daß für den Fall einer Wechselwirkung mit starken Säuren oder Basen die gebildeten Komplexe in 2 und 3 stark ionisiert sind. Dagegen sind die durch Eintritt von Neutralsalz daraus abgeleiteten 4 und 5 sehr wenig ionisiert und bilden viele Neutralteilchen.

Die vorliegende Untersuchung soll sich auf eine strengere Durcharbeitung einiger solcher Fälle von Ionisation und Hydratation nach dem Schema 2 bis 5 beschränken, die ein besonderes chemisches und einiges biologische Interesse bieten. Die hier durchgeführte Gliederung der Eiweißelektrolytbeziehungen kann selbstredend nur dem ersten Bedürfnisse nach einer allgemeinen Orientierung dienen, da in Wirklichkeit die Eiweißkörper als Ketten von Aminosäuren mit einer großen Zahl von, auch qualitativ nicht gleichwertigen Bindungsmöglichkeiten für Säuren, Laugen und Elektrolyte überhaupt ausgestattet sind, so daß in der Regel anstelle der einwertigen Ionen in den obigen schematischen Darstellungen, durch die

---

[1]) Näheres über diese Frage in einer demnächst erscheinenden Arbeit von Dr. K. Manabe (Tokio) und J. Matula.

[2]) Diese Zeitschr. 41, 461.

Reaktion mehrerer Elektrolytmoleküle mit einem Eiweißmoleküle, mehrwertige Eiweißionen treten werden. Durch eine gewisse Abstufung der Affinitäten können diese Reaktionen eines Eiweißmoleküls mit mehreren Elektrolytmolekülen den Charakter von Adsorptionsverbindungen erhalten. Die Zahl der mit einem Eiweißmolekül in Reaktion tretenden Elektrolytmoleküle und damit die Wertigkeit der gebildeten komplexen Eiweißionen ist übrigens nicht nur durch die Konstitution des Eiweißes, sondern vielfach durch die chemische Instabilität (hydrolytischer Zerfall) solcher hochwertiger Komplexe begrenzt.

Haben nun die bisherigen Untersuchungen gezeigt, daß zwischen ionischem und neutralem Eiweiß allgemein ein Unterschied in der Hydratation besteht, so hat deren Weiterführung ergeben, daß die gewaltige Hydratationssteigerung bei der Eiweißionisation an die Bildung mehrwertiger Ionen gebunden ist[1]. Daß eine solche für das Säure- und Alkalieiweiß vorliegt, lehrt schon die einfache Betrachtung der vom Eiweiß gebundenen Säure- bzw. Laugemengen. Diese sind selbst bei Zugrundelegung der niedrigsten angenommenen Werte für das Molekulargewicht von Eiweiß so hoch, daß sie die Bindung mehrerer Säure- oder Laugenmoleküle durch ein Eiweiß unbedingt beweisen. In dem gleichen Sinne sprechen Versuche von Pauli und Dukes[2], die zeigen, daß die bei der Bildung einfacher Aminosäureionen auftretende Hydratation viel zu geringfügig ist, um die gewaltige Reibungserhöhung ionischen Eiweißes zu erklären. Zugleich ließ die systematische Viscositätsuntersuchung von der einfachen Aminosäure über verschiedene Abbaustufen bis zum Eiweiß aufsteigend, die Zunahme der Hydratation mit der Wertigkeit der entstandenen Ionen deutlich erkennen.

I.

Wir haben in dieser Arbeit die Beispiele über den Zusammenhang von Ionisation und Hydratation zunächst durch ein besonderes vermehrt: durch die Untersuchung des Glutinsols. Einer Untersuchung von flüssigem, nicht abgebautem Glutin,

[1] Näheres in einer folgenden Arbeit von Pauli und M. Samec.
[2] Noch unveröffentlicht. Vgl. auch die vorausgehende Arbeit von J. Christiansen S. 226.

mit Hilfe der Viscositätsbestimmung, die über die Hydratationsänderungen desselben unter dem Einfluß von Elektrolyten Aufschluß geben sollte, stand bisher die Erstarrungstendenz solcher Glutine entgegen, die sich in einer zeitlich fortschreitenden Reibungszunahme kundgibt. In seiner bekannten Arbeit hat P. v. Schröder[1]) durch Bestimmung dieser zeitlichen Viscositätsänderung ein Maß für das Erstarrungsvermögen der Leimgallerte zu gewinnen versucht. Die Unmöglichkeit, unter den bisher gewählten Versuchsbedingungen konstante Viscositätswerte zu bestimmen, hatte eine spezielle Hydratationsuntersuchung in der Art, wie sie für das Albumin von Pauli und Handovsky durchgeführt wurde, nicht gestattet. Besondere Umstände machen jedoch die Kenntnis der Hydratationsbedingungen beim Glutinsol in hohem Maße wünschenswert. Denn unter den bisher untersuchten Eiweißkörpern muß gerade dem Glutin infolge seiner hohen Viscosität und seiner Befähigung, sehr wasserreiche Gallerten zu bilden, ein besonders großes Hydratationsvermögen der neutralen Teilchen zugesprochen werden. Ferner gestattet das Glutin infolge seiner eigenartigen chemischen Struktur manche interessante Beziehungen zwischen physikalisch-chemischen Eigenschaften und Konstitution zu prüfen. So fehlt ihm bekanntlich das Tyrosin vollständig und neuere Beobachtungen von Obermayer und Willheim[2]) mittels der Sörensenschen Formoltitration zeigen, daß das Glutin durch eine besondere Armut an endständigen Aminogruppen ausgezeichnet ist. Ferner zeigt das Glutin im elektrolytfreien Zustande, zum Unterschiede von sämtlichen echten Eiweißkörpern, eine so gut wie reversible Änderung bei mäßigem Erhitzen.

Wir gingen von der Anschauung aus, daß die mit sinkender Temperatur zunehmende Neigung zur Gallertbildung oberhalb einer gewissen kritischen Temperatur ausbleiben dürfte, da die Gallertbildung nach neueren Auffassungen, ähnlich wie ein Krystallisationsvorgang im wesentlichen in einer Aneinanderlagerung (stark hydratisierter) neutraler Komplexe bestehen dürfte (Pauli-Weimarn). Diese Auffassung findet auch in

---

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 45, 75, 1903.

[2]) Diese Zeitschr. 38, 331, und mündliche Mitteilung.

neueren Beobachtungen von Menz und Bachmann[1]) aus Zsigmondys Institut eine gewisse Stütze.

In der Tat hat sich gezeigt, daß für ein sehr schwach konzentriertes Glutinsol (0,3 bis 1 %), das konstant über 30° gehalten wird, die zeitliche Änderung der Viscosität bereits so gering ist, daß gut reproduzierbare Werte für die Reibungskoeffizienten erhalten werden. Wir benutzten mit der größten Sorgfalt elektrolytfrei gemachte Glutinpräparate[2]) zur Untersuchung der Hydratationsverhältnisse solcher Sole. Die von uns untersuchten Körper wurden in so geringer Konzentration angewendet, daß ihre spezifischen Gewichte keinen Einfluß auf die Viscosität ausüben konnten. So unterscheidet sich beispielsweise das spezifische Gewicht eines 0,3 %igen Glutinsols erst in der 4. Dezimalstelle von dem des Wassers. Es erschien daher durchaus angängig anstelle des Ausdruckes $\frac{t \cdot s}{t_0 s_0}$ für die relative innere Reibung die einfache Formel $\frac{t}{t_0}$ zu benutzen. Als Reibungsmethode[3]) diente die oft beschriebene Ostwald-Poisseulsche, im durchsichtigen Thermostaten. Zum Verständnis der Resultate sei vorausgeschickt, daß Säure oder Laugenzusatz beim Albumin die Bildung mehrwertiger elektropositiver oder elektronegativer Eiweißionen veranlaßt, die sich zunächst in einen bedeutenden Anstieg der Viscositätskurve bis zu einem Maximum mit wachsendem Säure- oder Laugengehalt kundgibt. Über dieses Maximum hinaus bewirkt weiterer Zusatz eine Zurückdrängung der Eiweißionisation und dementsprechend einen Abfall der Reibungskurve.

Ein gleiches Verhalten konnten wir bei unserem Glutin feststellen. Bei Salzsäure lag das Maximum bei $5 \cdot 10^{-3}$ n, und ebenso bei Natronlauge. Die Erhebung der Viscositätskurve

---

[1]) Vgl. R. Zsigmondy, Kolloidchemie. Leipzig 1912.

[2]) Solche Glutine flocken bekanntlich bei Zimmertemperatur in niedrigen Konzentrationen aus (Dhéré), sind jedoch, wie wir eben fanden, bei höherer Temperatur stabil. In dieser Weise wurden sie auch mit Erfolg in der Arbeit von Pauli und Flecker (l. c.) bei der Untersuchung der Schutzwirkung verwendet.

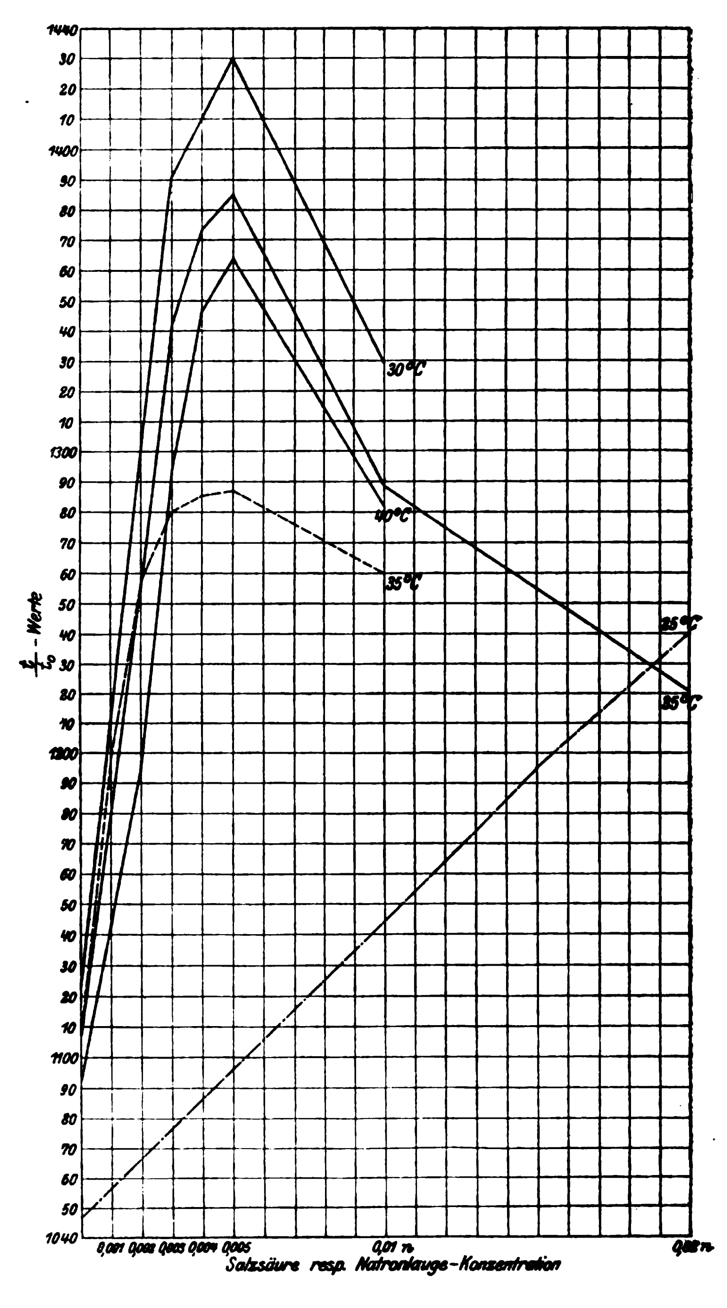
[3]) Über die Kautelen bei der Untersuchung von Eiweißlösungen, die an unserem Institute beobachtet werden, siehe C. Schorr, diese Zeitschr. 37, 424 und J. Christiansen, l. c.

ist eine ganz gewaltige, absolut und relativ unvergleichlich höher und steiler als beim Albumin. Sehr lehrreich ist der Vergleich solcher Kurven, die bei verschiedenen Temperaturen gewonnen wurden. Der Anstieg der Reibung sowohl für eine neutrale als für eine Säuregelatine, stets bezogen auf Wasser der gleichen Temperatur, wächst bedeutend mit abnehmender Temperatur, ganz entsprechend der Auffassung, daß in diesem Falle die Viscosität nicht mit Änderungen des Lösungsmittels, sondern mit der Hydratation der dispersen Teilchen zusammenhängt. Daß die Hydratation im allgemeinen mit sinkender Temperatur wächst, hat sich bei der Untersuchung der verschiedensten Körperklassen als Regel herausgestellt. Die folgende Tabelle I und Kurvenschar (Fig. 1) läßt alle diese Ergebnisse deutlich hervortreten. Sie ist des Vergleiches halber noch durch die parallelen Werte für 1 % Säurealbumin (Rinderserum) ergänzt, die bei 25° gewonnen wurden, da das reine Albumin, wie frühere Untersuchungen zeigten, bei Temperaturen darüber hinaus nicht mehr beständig ist.

Tabelle I (Fig. 1).

Salzsäure-konzentration	$\frac{t}{t_0}$ für 0,3 % Glutin bei			$\frac{t}{t_0}$ für 1 % Albumin bei 25°
	30°	35°	40°	
0	1,1236	1,1069	1,0934	—
0,002 n	1,3018	—	1,1964	—
0,0025 n	—	1,2970	—	—
0,003 n	1,3905	1,3423	1,2938	—
0,004 n	1,4077	1,3743	1,3463	—
0,005 n	1,4302	1,3850	1,3638	—
0,01 n	1,3291	1,2889	1,2821	1,1401
0,02 n	—	1,2202	—	1,2409

Mit steigendem Glutingehalt kommt es zu einem unverhältnismäßig gewaltigen Anstieg der inneren Reibung. Zugleich wird, da die vom Glutin gebundene Säuremenge zunehmen muß, die Lage des Reibungsmaximums gegen eine höhere Säurekonzentration verschoben. Die Verschiebung ist jedoch keineswegs proportional der Glutinkonzentration. Einer Vermehrung der letzteren um das Dreifache entspricht eine Verschiebung des Maximums nahe um die doppelte Säurekonzentration. Die Abhängigkeit von Viscosität und Konzen-

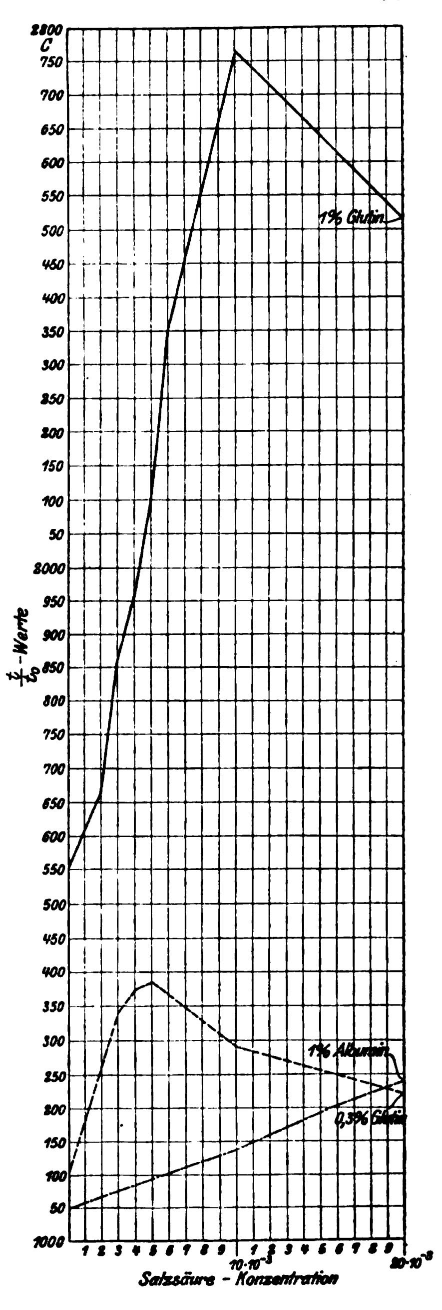


——— 0,3 % Glutin + Salzsäure.
- - - - 0,3 % Glutin + Natronlauge.
—·—·— 1 % Albumin + Salzsäure bei 25 ° C.

Fig. 1.

tration wird durch die folgende Tabelle II und Fig. 2 wiedergegeben, die einer weiteren Erläuterung nicht bedarf.

Von nicht geringerem Interesse als das Verhalten des Säureglutins sind die Viscositätsänderungen beim Laugenglutin, die den Gegenstand einer weiteren Versuchsreihe bildeten. Da das Eiweiß als schwache Säure eine, wenn auch sehr mäßige Anzahl von negativen Ionen im reinen Zustand zu bilden vermag, so ist bei Zusatz von Alkali, solange derselbe zur einfachen Substituierung der vorhandenen Wasserstoffionen durch Natriumionen führt, eine Änderung der Eiweißionenkonzentration nicht zu erwarten. Erst eine weitere Laugenzufuhr wird vermehrte Ionisation und schließlich Bildung mehrwertiger negativer Eiweißionen durch die Bindung einer ganzen Zahl von Natriumionen seitens eines Eiweißmoleküls zur Folge haben. Diesem Verlaufe des Absättigungsvorganges wird ein mächtiger Anstieg der Reibungskurve durch die mit der Ionisationsvermehrung einhergehende Steigerung der Hydratation entsprechen. Daß diese Kurve im weiteren Ver-



——— 1 % Glutin + Salzsäure bei 35° C.
- - - - - 0,3 % Glutin + Salzsäure bei 35° C.
—·—·— 1 % Albumin + Salzsäure bei 25° C.

Fig. 2.

Tabelle II (Fig. 2).

Versuchstemperatur 35°.

Salzsäure-konzentration	1% Glutin	0,3% Glutin
0	1,5540	1,1069
0,002 n	1,6644	—
0,003 n	1,8598	1,3423
0,004 n	1,9563	1,3743
0,005 n	2,0988	1,3850
0,006 n	2,3494	—
0,01 n	2,7632	1,2889
0,02 n	2,5149	1,2202

laufe ein Maximum der Reibung aufweist, ist in ganz analoger Weise verständlich wie beim Säureglutin. Nur ein Umstand verdient noch besondere Erwähnung: das ist die weit geringere Höhe des Maximums der Alkalikurve, verglichen mit der des Säureglutins, während beim Säurealbumin nach den Untersuchungen von Pauli und Handovsky (l. c.) die Reibungsmaxima bei Säure- und Laugenzusatz nahezu gleich hoch liegen. Dieses unterschiedliche Verhalten der zwei Eiweißkörper kommt auch in anderen Reaktionen zum Ausdruck, doch muß bezüglich weiterer Einzelheiten auf die Untersuchungen von Pauli und Flecker (l. c.) sowie mit Samec verwiesen werden. Die Versuchsreihe Tabelle III (Fig. 1) illustriert diese Verhältnisse.

Tabelle III (Fig. 1).

Natronlauge-konzentration	0,3% Glutin B bei 35°	Natronlauge-konzentration	0,3% Glutin A bei 35°
0	1,1106	0	1,1069
$1\cdot10^{-5}$ n	1,1106	$1\cdot10^{-3}$ n	1,1943
$5\ 10^{-5}$ n	1,1149	$2\cdot10^{-3}$ n	1,2567
$7\cdot10^{-5}$ n	1,1171	$3\cdot10^{-3}$ n	1,2798
$1\cdot10^{-4}$ n	1,1249	$4\cdot10^{-3}$ n	1,2817
		$5\cdot10^{-3}$ n	1,2870
		$1\cdot10^{-2}$ n	1,2603

Eine weitere Versuchsreihe war einer genaueren Prüfung der Dehydratation von Säureeiweiß durch Neutralsalz gewidmet, die allgemein nach den Ergebnissen der Versuche von Pauli und Handovsky auf der Entstehung einer sehr wenig ionisierten komplexen Säureeiweiß-Neutralsalzverbindung beruht. Die Rolle, die den verschiedenen Anionen des zugesetzten

Neutralsalzes bei dieser Dehydratation zukommt, war jedoch in den erwähnten Untersuchungen nicht näher erörtert worden. Nur in einer älteren Arbeit von Pauli[1]) war mittels Bestimmung der Temperatur der Hitzegerinnung die Anionenreihe nach dem Grade ihrer Wirksamkeit bei der Wärmekoagulation festgestellt worden, die nach zunehmender Beförderung der Hitzegerinnung geordnet lautete: Chlorid—Bromid—Nitrat—Sulfocyanid—Sulfat. Wiewohl durch die neueren Arbeiten am Institute festgestellt erscheint, daß die Hitzegerinnung mit der Neutralteilbildung zusammenhänge, schien es doch von Wert, auf dem Wege der Viscositätsbestimmung die Reihenfolge zu bestimmen, in der Salze mit verschiedenem Anion dehydratisierend auf das Säureeiweiß wirken. Die folgende Tabelle IV und zugehörige Kurvenschar (Fig. 3), die am Serumalbumin ermittelt wurden, geben die gefundenen Werte wieder.

Tabelle IV (Fig. 3).

Überall 0,01 n-Salz.

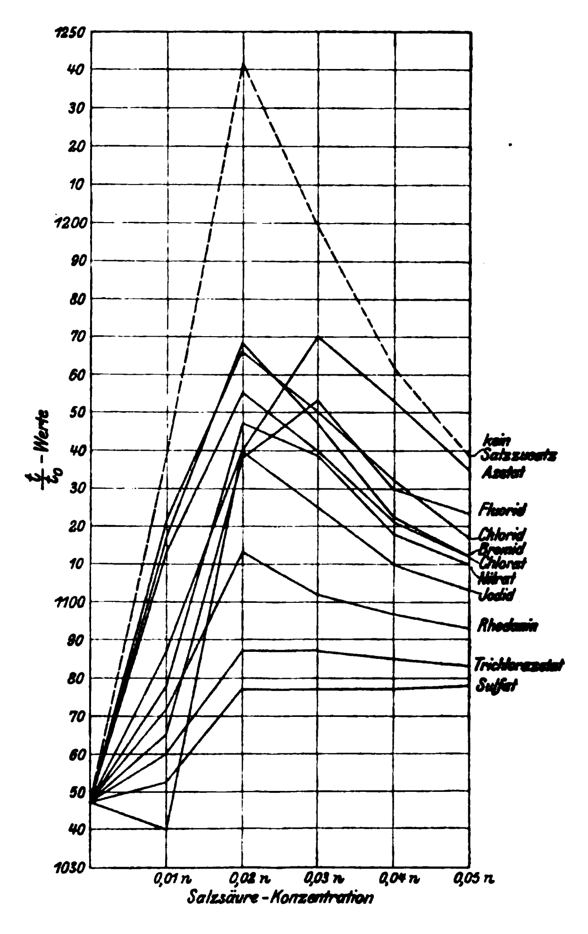
HCl-Konzentration	Acetat	Fluorid	Chlorid	Bromid	Chlorat	Nitrat	Jodid	Rhodanid	Trichlor-acetat	Sulfat
0,01 n	1,0399	1,0649	1,1206	1,1165	1,1132	1,0779	1,0865	1,0716	1,0599	1,0532
0,02 n	1,1398	1,1381	1,1657	1,1681	1,1547	1,1474	1,1398	1,1132	1,0865	1,0765
0,03 n	1,1698	1,1531	1,1498	1,1465	1,1398	1,1389	1,124[illegible]	1,1015	1,0865	1,0765
0,04 n	1,1531	1,1298	1,1316	1,1231	1,1208	1,1182	1,1100	1,0965	1,0849	1,0765
0,05 n	1,1348	1,1231	1,1170	1,1115	1,1115	1,1101	1,1032	1,0932	1,0832	1,0782

Die vollständige Reihe lautet nach zunehmender Dehydratation für 0,05 n-Salzsäure geordnet: Acetat—Fluorid—Chlorid—Bromid—Chlorat—Nitrat—Jodid—Sulfocyanid—Trichloracetat—Sulfat.

Im einzelnen wäre noch folgendes zu bemerken: Die Reihenfolge nach der dehydratisierenden Wirkung stimmt durchaus mit der früher gefundenen, die Hitzekoagulation befördernden überein. Acetat und Fluorid verschieben gleichzeitig die Lage des Reibungsmaximums, die bei allen übrigen Salzen sowie beim reinen Säureeiweiß in der Nähe von 0,02 n-Salzsäure liegt, gegen 0,03 n-Salzsäure. Diese Wirkung ist ohne weiteres verständlich, wenn man in Betracht zieht,

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 10, 53, 1907.

daß diese beiden Salze zugleich durch Umsetzung in ihre schwach ionisierten Säuren die Wasserstoffionenkonzentration vermindern. Beim Acetat in einer sehr niedrigen Säure-



----- 1 % Albumin + Salzsäure.
——— 1 % Albumin + Salzsäure + Neutralsalz.

Fig. 3.

konzentration (0,005 n) kommt noch hinzu, daß es nicht nur abstumpfend auf die Acidität wirkt, sondern daß die gleichzeitige Neutralsalzwirkung wie bei reinem neutralen Eiweiß [Pauli und Handovsky[1])] bei der Depression der Zähig-

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 415, 1908.

keit mitwirkt. Die mächtige dehydratisierende Wirkung von Trichloracetat und Sulfat findet ihr Seitenstück in früheren Beobachtungen von Pauli und Handovsky[1]), die zeigten, daß Trichloressigsäure- und Schwefelsäureprotein ein nur sehr wenig ionisiertes Salz vorstellen. Schließlich wäre noch darauf hinzuweisen, daß das Chlorid im Reibungsmaximum etwas unterhalb des Bromids zu liegen kommt, so daß ein Überkreuzen der Kurven in der Gegend des Maximums stattfindet. Diese geringe Abweichung erscheint als das Resultat einer merklichen Zurückdrängung der Ionisation des Eiweißchlorids durch das gleichionige Chlornatrium, die sich der Neutralsalzwirkung superponiert.

Im Anschluß an diese Versuche sollte die bisher nicht untersuchte Salzionenwirkung auf das reine Glutinsol geprüft werden. Wie die folgende Tabelle V zeigt, liegen hier die Verhältnisse durchaus analog den beim Säurealbumin gefundenen, nur ist im allgemeinen die dehydratisierende Wirkung des Trichloracetats in den untersuchten Säurekonzentrationen etwas geringer als beim Säurealbumin, so daß es in der Reihe vor das Jodid tritt. Bemerkenswerterweise findet hier keine wesentliche Änderung in der Reihenfolge der Anionen beim Übergang von Säure- zu Alkaligelatine statt, doch verringern sich die im Bereiche der einwertigen Anionen vorhandenen Unterschiede bei der Alkaligelatine um ein geringes, verglichen mit denen beim Säureglutin.

Tabelle V.

Überall 0,3 % Glutin, die Versuchstemperatur betrug 30°.
Angewandte Neutralsalzkonzentration: 0,01 n.

Neutralsalz	0,005 n-HCl	0,01 n-HCl	0,01 n-NaOH
Ø	1,3916	1,3200	1,3010
Chlorid	1,2316	1,2548	1,2232
Bromid	1,2274	1,2358	1,2210
Chlorat	1,2253	1,2316	1,2148
Nitrat	1,2274	1,2274	1,2189
Trichloracetat . .	—	1,2253	1,2148
Jodid	1,2232	1,2189	1,2126
Rhodanid	1,2106	1,2106	1,2084
Sulfat	1,1453	1,1642	1,1979

[1]) Diese Zeitschr. 18, 340, 1908.

II.

Den Hauptanteil der vorliegenden Versuche sollte jedoch eine genauere Durcharbeitung einer sehr merkwürdigen Erscheinung bilden, die gelegentlich einer früheren Studie über die Beziehungen der amphoteren Elektrolyte zum Eiweiß, am Institut beobachtet worden war. Handovsky[1]) hatte gefunden, daß Coffeinzusatz regelmäßig die Viscosität von Säureeiweiß in beträchtlichem Maße zu steigern befähigt sei, ein Verhalten, das in dieser Weise bei keinem einzigen der sonst geprüften organischen, basischen oder amphoteren Stoffe nachzuweisen war, während bei den oben mitgeteilten Versuchen, wo überhaupt eine Wirkung sich zeigte, stets Fälle von Abnahme der Hydratation des ionischen Eiweißes, durch zugesetzte Substanzen vorliegen, handelt es sich bei der Coffeinwirkung auf das Säureeiweiß um eine Steigerung der Hydratation, deren Wesen näher zu erforschen nicht nur aus chemischen Gründen, sondern auch mit Rücksicht auf die eminente biologische Wirksamkeit des Coffeins von besonderem Interesse war.

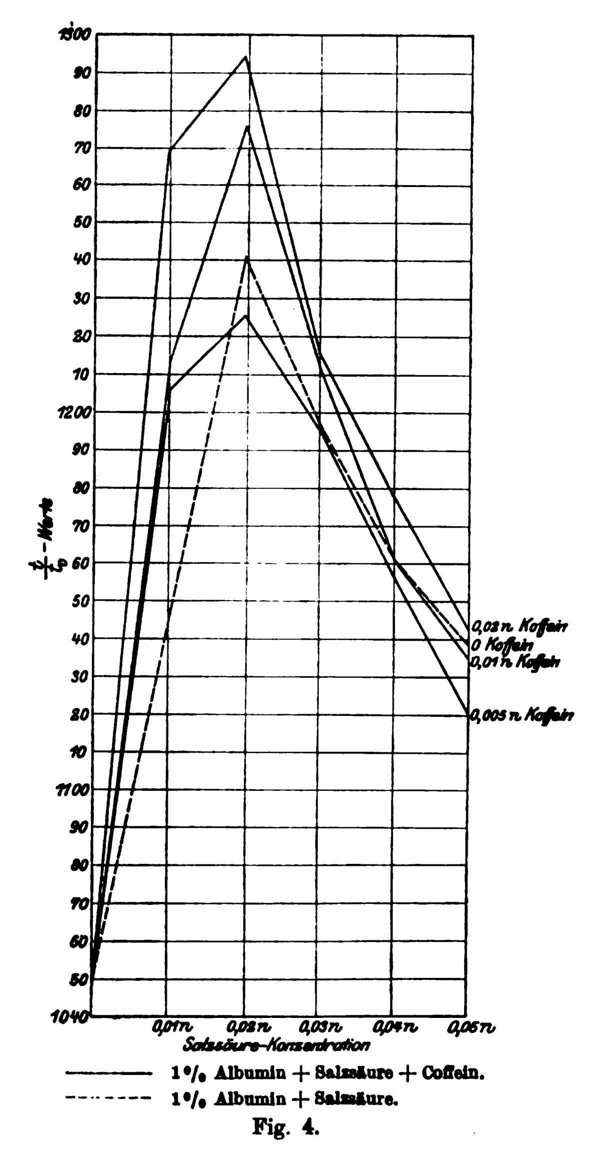
Die Frage, ob die beim Coffeinphänomen beobachtete Hydratationsvermehrung in ihrem Wesen verwandt sei mit jener Hydratationssteigerung, die in hohen Säure- und besonders Laugenkonzentrationen als Vorstufe des hydrolytischen Abbaues des Proteins auftritt, ließ sich durch eine Prüfung der Reversibilität der Coffeinhydratation entscheiden. Die dem Eiweißabbau unmittelbar vorausgehende Hydratation[2]) ist eine zeitlich rasch fortschreitende und geht mit einer irreversiblen Änderung des Proteins einher. Dagegen erwies sich, wie der folgende Versuch zeigt, bei der gewählten Temperatur von 25° der Reibungswert des Säureeiweißes bei Coffeinanwesenheit, als konstant und gut reproduzierbar. Ferner gelang es ohne weiteres durch Beseitigung von Säure und Coffein mittels Dialyse, den ursprünglich ermittelten Reibungskoeffizienten des Serumeiweißes auch nach Tagen wieder zu finden.

Zu diesem Zwecke wurde die Viscosität einer Probe mit 0,02 n-Salzsäure, 0,01 n-Coffein und 0,93% Eiweiß mit $\eta = 1{,}2739$ bestimmt. Bei diesem Werte ist die Reibung des reinen Coffeins schon in Abrechnung gebracht. Ohne das Coffein betrug der Reibungskoeffizient des

[1]) Diese Zeitschr. 25, 510.

[2]) C. Schorr, l. c.

Säureeiweißes 1,2409. Durch eine 8tägige Dialyse gegen destilliertes Wasser fiel der Gehalt des Serums auf 0,412 % Eiweiß. Wurde das



——— 1 % Albumin + Salzsäure + Coffein.

- - - - - 1 % Albumin + Salzsäure.

Fig. 4.

ursprüngliche neutrale Eiweiß durch Verdünnen mit Wasser gleichfalls auf diesen Trockengehalt gebracht, so zeigten die beiden Proben den übereinstimmenden Wert von $\eta = 1,0333$. Es war also jede Coffein- und Säurewirkung auf die Reibung wieder restlos verschwunden.

In einer Reihe von Versuchen wurde weiter die Abhängigkeit der Erscheinung von der Coffein- und von der Säurekonzentration ermittelt. Zunächst wurden in einer Serie von Proben mit wachsendem Säuregehalt Zusätze von purem Coffein und zwar 0,005 n, 0,01 n und 0,02 n vorgenommen. Wir dürfen infolge der sehr geringen Basizität des Coffeins annehmen, daß in den hier verwendeten Konzentrationen eine Bindung des Purinkörpers an die Salzsäure nur in verschwindendem Maße erfolgt[1]). Erst durch Verwendung eines Überschusses an Säure kommt es infolge Zurückdrängung der hydrolytischen Dissoziation zur Bildung nennenswerter Mengen von Coffeinchlorid. Dieser Umstand tritt auch bei den folgenden Versuchen in Erscheinung. In niederen Säurekonzentrationen liegt die Reibungskurve von Säureeiweiß bei Coffeinanwesenheit, stets über der des reinen Säureeiweißes. Die Lage des Reibungsmaximums bleibt ungeändert. Erst in höheren Säurekonzentrationen kommt es infolge der Salzwirkung des gebildeten Coffeinchlorids, zu einer Depression unter die Kurve des reinen Säureeiweißes. Bei 0,005 n-Coffein wird die Depression in 0,02 n-Salzsäure, bei 0,01 n-Coffein in 0,05 n-Salzsäure erkennbar.

Tabelle VI (Fig. 4).

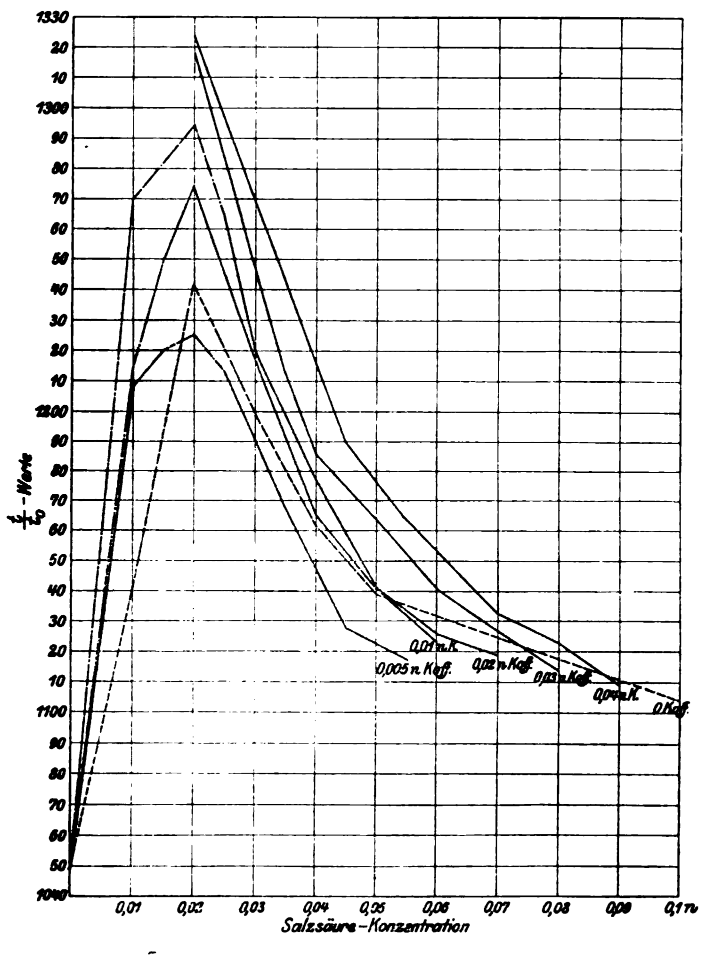
Die Versuchstemperatur betrug 25°. Die Reibung des Coffeins wurde wie in sämtlichen Versuchen bei allen Werten abgezogen, so daß die gefundene Viscositätssteigerung nur zu klein, nicht zu groß sein kann.

Salzsäure-konzentration	Kein Coffeinzusatz	0,005 n-Coffein	Prozent. Erhöhung durch 0,005n-Coffein	0,01 n-Coffein	Prozent. Erhöhung durch 0,01 n-Coffein	0,02 n-Coffein	Prozent. Erhöhung durch 0,02 n-Coffein
0,01 n	1,1401	1,2057	46,82	1,2128	51,89	1,2689	91,94
0,02 n	1,2409	1,2253	− 6,48	1,2756	14,40	1,2943	22,17
0,03 n	1,1990	1,1966	− 9,75	1,2128	14,42	1,2160	8,54
0,04 n	1,1623	1,1572	− 3,14	1,1617	− 0,37	1,1789	10,23
0,05 n	1,1389	1,1198	− 14,07	1,1361	− 2,06	1,1428	2,81

Um den untersuchten Konzentrationsbereich weiter auszudehnen, wurden unter Verwendung des weit löslicheren Coffeinchlorids die entsprechenden Kombinationen mit Salz-

[1]) In dem gleichen Sinne sprachen von uns ausgeführte Gefrierpunktsbestimmungen, ebenso (s. u.) Messungen der Leitfähigkeit des Coffeinsalzes, sowie von Herrn J. Matula ausgeführte elektrometrische Bestimmungen der H- und Cl-Ionenkonzentration.

säure[1]) hergestellt, was eine Untersuchung bis zum Gehalte von 0,04 n-Coffein gestattete. Zunächst zeigte sich bei diesen Versuchen, daß die unter Verwendung des Coffeinsalzes er-



——— 1 % Albumin + Coffeinum hydrochloricum + Salzsäure.
- - - - 1 % Albumin + Salzsäure.

Fig. 5.

haltenen Reibungskurven in sehr befriedigender Weise mit den früheren, durch Zusatz von Coffeinum purum erhaltenen, über-

[1]) Die Salzsäure des Coffeinchlorids wurde als gleichwertig der freien zugesetzten Salzsäure in Rechnung gebracht.

einstimmen. Mit der Steigerung des Coffeingehaltes wuchs auch die Reibungserhöhung, allerdings nicht proportional, sondern deutlich abnehmend und, wie zu erwarten, wurden die zur Erzielung einer depressorischen Wirkung des Coffeinsalzes nötigen Säuremengen, immer größer; für 0,03 n-Coffein, 0,08 n-Salzsäure, für 0,04 n-Coffein, 0,09 n-Salzsäure. Die Einzelheiten bringen die folgende Tabelle VII der Reibungswerte und die zugehörigen Kurven.

Tabelle VII (Fig. 5).

Salzsäure-konzentration	Kein Coffein-zusatz	0,005 n-Coffein	0,01 n-Coffein	0,02 n-Coffein	0,03 n-Coffein	0,04 n-Coffein
0,01 n	1,1401	1,2084	—	—	1,2697	—
0,015 n	1,1964	1,2195	1,2492	—	—	—
0,02 n	1,2409	—	1,2729	—	1,3172	1,3242
0,025 n	—	1,2132	—	1,2626	—	—
0,03 n	1,1990	—	1,2170	1,2167	—	—
0,035 n	—	1,1673	—	—	1,2127	—
0,04 n	1,1623	—	1,1653	1,1771	1,1858	—
0,045 n	—	1,1277	—	—	—	1,1897
0,05 n	1,1389	—	1,1409	1,1406	1,1635	—
0,055 n	—	1,1183	—	—	—	1,1643
0,06 n	—	—	1,1225	1,1258	1,1407	1,1431
0,07 n	—	—	—	1,1187	1,1274	1,1329
0,08 n	—	—	—	—	1,1141	1,1228
0,09 n	—	—	—	—	—	1,1094

Salzzusatz bewirkt auch beim Coffein-Säureeiweiß eine Abnahme der Reibung ohne die Coffeinwirkung aufzuheben, so daß die Reibungskurve von Säureeiweiß plus Neutralsalz mit Coffein nahezu parallel oberhalb der Kurve ohne Coffein gelegen erscheint. Die zur folgenden Tabelle VIII gehörigen Kurven (Fig. 6) zeigen diese Verhältnisse sehr deutlich.

Tabelle VIII (Fig. 6).

0,02 n-Salzsäure + $NaNO_3$	Ohne Coffein	0,02 n-Coffein
0,02 n-$NaNO_3$	1,1096	1,1376
0,01 "	1,1474	1,1708
0,005 "	1,1851	1,2121

Die Coffeinwirkung, die an die Anwesenheit von Säureeiweiß geknüpft ist, läßt sich ebensogut wie am Salzsäurealbumin an der Eiweißverbindung mit einer anderen Säure

beobachten. Im Folgenden (Tabelle IX) ist zunächst als Ergänzung der in der Literatur vorliegenden Beobachtungen die Reibungskurve des Monochloressigsäure-Eiweißes wiedergegeben, deren Maximum erst bei 0,06 n erreicht ist und etwas unterhalb des Maximums beim Salzsäure-Eiweiß liegt. Der Wert bei 0,02 Monochloressigsäure 1,1583 wird durch 0,01 n-Coffein auf 1,1815 und durch 0,02 n-Coffein auf 1,1949 erhöht. Zu bemerken wäre noch, daß die entsprechende Reibung der Monochloressigsäure, die für eine 0,1 n-Lösung 1,0148 beträgt, bei den Werten in Abzug gebracht wurde.

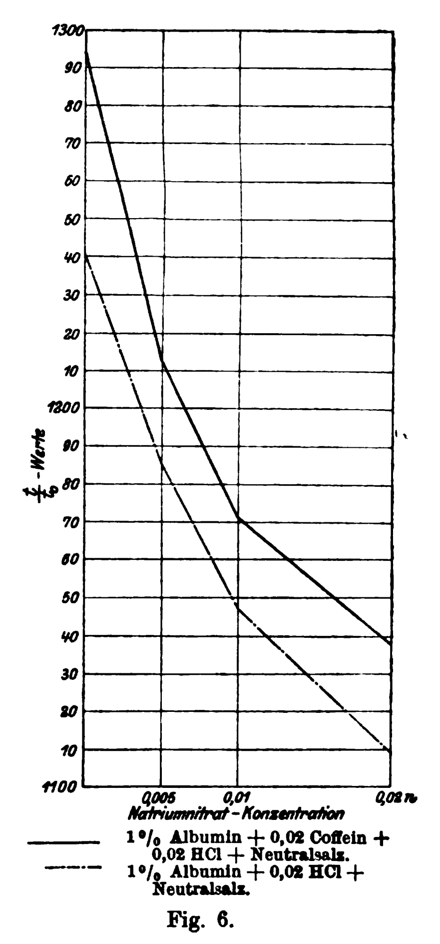


Fig. 6.

Unzweifelhaft kommt den Anionen der verwendeten Säure eine Bedeutung für die Hydratationssteigerung durch das Coffein zu. Vergleicht man nämlich die Wirkung derselben Coffeindosen an Punkten gleicher Reibung der Salzsäureeiweißkurve und der Monochloressigsäure-Eiweißkurve, so zeigt sich die bedeutende Überlegenheit der Coffeinwirkung beim Eiweißchlorid. Darüber gibt die folgende Tabelle (X) Aufschluß, die die zum gleichen Reibungswert der Salzsäure und der Monochloressigsäure gehörigen η-Werte bei Coffeinanwesenheit enthält.

Geht man zu Säuren über, die noch weniger Eiweißionen zu bilden imstande sind als die Monochloressigsäure, z. B. Essigsäure oder Trichloressigsäure, so sind die Unterschiede der Reibung von Coffeineiweiß, die abhängig vom Säureion sind, noch schlagender. Eine 0,02 n-Essigsäure, die die Reibung des Serums

Tabelle IX (Fig. 7).

Monochloressigsäurekonzentration	$\frac{t}{t_0}$ bei 25° für 1 % Serum	Zusatz von 0,01 n-Coffein	Zusatz von 0,02 n-Coffein
0,01 n	1,1020	—	—
0,02 n	1,1583	1,1815	1,1949
0,03 n	1,1953	—	—
0,04 n	1,2090	—	—
0,05 n	1,2156	—	—
0,06 n	1,2236	—	—
0,07 n	1,2126	—	—
0,08 n	1,1909	—	—
0,1 n	1,1813	—	—

——— 1 % Albumin + Monochloressigsäure.
- - - - 1 % Albumin + Salzsäure.

Fig. 7.

von 1,0471 auf 1,0726 erhöht, gibt bei Coffeinzusatz keine weitere Steigerung der Eiweißreibung. (Die beobachteten und die additiv aus der puren Coffeinreibung berechneten Werte

Tabelle X.

Coffein-Konzentration	0,02 n-Monochloressigsäure	Entsprechende Reibungswert für Salzsäure 0,011 n
0	1,1583	1,1583
0,01 n	1,1815	1,225
0,02 n	1,1949	1,274

stimmen überein.) Ähnlich liegen die Dinge bei der Trichloressigsäure, bei der der beobachtete Wert sogar etwas unter den berechneten fällt. Zum Vergleiche sind in der folgenden Tabelle XI die durch graphische Interpolation aus den Versuchen ermittelten parallelen Werte beim Salzsäureeiweiß derselben Reibung daneben gestellt.

Tabelle XI.

Säure	Kein Coffeinzusatz	0,01 n-Coff. beobachtet	0,01 n-Coff. berechnet	0,02 n-Coff. beobachtet	0,02 n-Coff. berechnet	Entsprechender Reibungswert bei HCl mit 0,02 n-Coffeinzusatz
0,02 n-Essigsäure .	1,0726	1,0766	1,0766	1,0793	1,0806	1,1185
0,02 n-Trichloressigsäure	1,0807	—	—	1,0860	1,0887	1,132

Von dem Coffein nahestehenden Körpern wurden noch das Theophyllin, ein 1,3 Dimethylxanthin, und das Theobromin, ein 3,7 Dimethylxanthin, auf ihre Hydratationsbeeinflussung von Säureeiweiß untersucht. Bei dem Theobromin war die Löslichkeit auch des Chlorids nicht ausreichend, so daß die nach tagelangem Gleichgewicht mit der Substanz gewonnene Lösung nur einen ganz minimalen Trockengehalt (entsprechend 0,0006 n) hatte und keine Änderung in der Reibung des Säureeiweißes bewirkte.

Dagegen waren die Versuche am besser löslichen Theophyllin positiv und ergaben in bezug auf die Form und den Verlauf der Reibungskurve des Säureproteins analoge Verhältnisse wie das Coffein. Die Wirkung des Theophyllins steht jedoch hinsichtlich ihrer Ausgiebigkeit hinter der des Coffeins wesentlich zurück. Die folgende Tabelle XII enthält die betreffenden Vergleichswerte nebeneinandergestellt.

Tabelle XII (Fig. 8).

Salzsäure-konzentration	Säureiweiß	Säureeiweiß mit		
		0,01 n-Theophyllin	0,02 n-Theophyllin	0,02 n-Coffein
0,01 n	1,1401	1,2277	1,2459	**1,2689**
0,02 n	1,2409	1,2576	1,2682	**1,2943**
0,03 n	1,1990	1,1971	1,2043	**1,2160**
0,04 n	1,1623	1,1588	1,1611	**1,1789**
0,05 n	1,1389	1,1308	1,1327	**1,1428**

Durch die Zuvorkommenheit des Herrn Geheimrats Prof. H. H. Meyer standen uns einige interessante, zum Teil bisher noch nicht beschriebene Substitutionsderivate des Coffeins zur Verfügung. Sämtliche sind durch Substitution des Wasserstoffs am 8. Kohlenstoff im Purinring gewonnen, und zwar das:

Dimethylaminocoffein:

```
CH3N — CO
 |     |  CH3
 CO    C—N          CH3
 |     ||    \     /
 |     ||     >C.N<
 |     ||    /     \
CH3N — C—N          CH3
```

das Acetylaminocoffein:

```
CH3N — CO
 |     |  CH3
 CO    C—N
 |     ||   \
 |     ||    >C.NH.OC.CH3
 |     ||   /
CH3N — C—C
```

das Diäthylglykokollaminocoffein:

```
CH3.N — CO
 |      |  CH3
 CO     C—N
 |      ||   \
 |      ||    >C.NH.OC
 |      ||   /       |
CH3N — C—N           |
                     C.N(CH5)2
```

das salzsaure Coffeinäthylendiamin (Coffamin):

```
CH3.N — CO
 |      |  CH3
 CO     C—N
 |      ||   \
 |      ||    >C.NH.CH2
 |      ||   /       |
CH3.C — C—N          |
                NH2.CH2.HCl
```

und die schon früher dargestellte Coffeinammoniumbase (Kaffon) (Beilstein 8, 959).

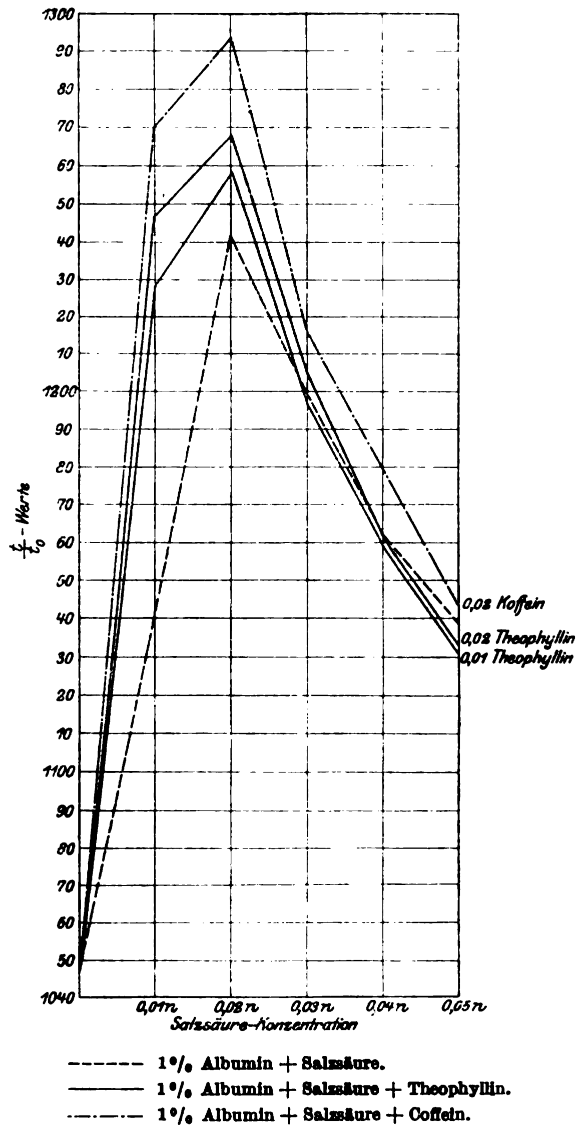


Fig. 8.

Von diesen Stoffen war das Dimethylaminocoffein und das Acethylaminocoffein nicht genug wasserlöslich, dagegen waren

die übrigen gut löslich. Über die Versuche, die an einem 0,8 $^0/_0$igen und einem 1,1 $^0/_0$igen Serumalbumin vorgenommen wurden, geben Tabelle XIII und XIV Aufschluß.

Tabelle XIII.

Versuche am 0,8 $^0/_0$igen Serum. Der Reibungswert des reinen Serums beträgt 1,032.

Base	Base in wässeriger Lösung	Base + Salzsäureserum-mischung	
		η beobachtet	η' berechnet
0,2 n-Diäthylglykokollamino-coffein + 0,02 n-HCl	1,0169	1,0528	1,2018
0,02 n-Coffeinäthylendiamin + 0,02 n-HCl	1,0169	1,0452	1,2018
0,02 n-Coffeinammoniumbase + 0,02 n-HCl	1,0132	1,1981	1,1981
0,02 n-Coffein + 0,02 n-HCl	1,0081	1,2169	1,1930

Tabelle XIV.

Versuche am 1,1 $^0/_0$igen Rinderserum. Die Reibung des reinen Serums beträgt 1,0566.

Base	Salzsäure-Konzentration	Base + Salzsäureserum-mischung	
		η beobachtet	η' berechnet
0,02 n-Diäthylglykokollamino-coffein	0,02 n	1,0642	1,3207
	0,03 n	1,1132	1,2528
0,02 n-Coffeinäthylendiamin	0,02 n	1,0604	1,3207
	0,04 n	1,1830	1,2056
	0,05 n	1,1868	1,1867
0,02 n-Coffeinammoniumbase	0,02 n	1,3150	1,3170
	0,04 n	1,2019	1,2019
0,02 n-Coffein	0,02 n	1,3490	1,3119

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Coffeinammoniumbase sich vollkommen indifferent verhält, dagegen die anderen beiden Präparate keine Hydratationssteigerung, sondern die depressorische Wirkung von Neutralsalzen erkennen lassen, die so stark ist, daß eine nahezu quantitative Bindung der Säure an die betreffenden Coffeinderivate angenommen werden muß.

Sehr bemerkenswert sind die Ergebnisse bei der Ausdehnung der Untersuchung der Coffeinwirkung auf verschiedene Eiweißkörper. Während das Albumin von Rind und Pferd[1]) sich gleichartig verhielt, war an dem gegen Säure so hoch empfindlichen Glutin kein Effekt des Coffeins wahrzunehmen. Berechnete und gefundene Werte stimmen hier vollständig überein.

Tabelle XV.

Koffeinwirkung auf 0,8%iges Säureglutin bei 35° C.

Salzsäurekonzentration	Mischung: HCl-Glutin-0,02 n-Coffein	
	beobachtet	berechnet
0,005 n	1,3922	1,3917
0,02 n	1,2280	1,2269

Bekanntlich zeigt die Leimgallerte in der Hinsicht eine Übereinstimmung mit dem Glutinsol, daß Säure bei der Gallerte eine ganz gewaltige Quellungsvermehrung bewirkt, die mit der Reibungserhöhung beim Sol korrespondiert. Wie weit hier die Reaktionsempfindlichkeit geht, haben Versuche von R. Chiari[2]) am Institute dargetan, der durch die Quellungsvermehrung den Kohlensäuregehalt des destillierten Wassers nachweisen konnte. Es war deshalb mit Hilfe der Quellungsbestimmung möglich, die Hydratationsbeeinflussung von saurer Glutingallerte durch Coffein in einer quantitativ höchst vollkommenen Weise zu prüfen.

Methodik: Zu diesem Zwecke wurden in Wägegläschen Stücke einer durch Dialyse extrem gereinigten Gelatine von festgestelltem Trockengehalt ausgewogen, hierauf in größeren Präparatengläsern von 500 ccm Inhalt mit der zu untersuchenden Flüssigkeit zusammengebracht. Sämtliche Vergleichsproben der verschiedenen Lösungen wurden gleichzeitig aufgestellt und in demselben Raum gehalten. Nach 24 Stunden wurden

---

[1]) Folgende Tabelle gibt ein Beispiel von der Wirkung des Coffeins auf Pferdeserum (Serumkonzentration 1%).

Salzsäurekonzentration	Kein Coffeinzusatz	0,02 n-Coffein
0	1,0603	—
0,02 n	1,2981	1,3316

[2]) Diese Zeitschr. 33, 167.

die gequollenen Gallertstückchen auf Filtern von der Quellungsflüssigkeit getrennt, von den anhaftenden Tröpfchen sorgfältig befreit und wieder zur Wägung gebracht. Der Quellungsgrad wurde, wie dies seit den Hofmeisterschen Versuchen üblich, durch den Wassergehalt bezogen auf 1 g trockener quellender Substanz ausgedrückt.

Die folgende Versuchsreihe (Tabelle XVI), in der Säurekonzentration und Temperatur variiert wurden, läßt neben der gewaltigen Säurewirkung das Ausbleiben eines Coffeineinflusses auf den Quellungsvorgang erkennen, da Schwankungen um einige Prozente innerhalb der Versuchsfehler liegen und jedenfalls neben der gewaltigen Säurewirkung vollständig verschwinden.

Tabelle XVI.

Coffeinkonzentration	Quellungsgrad ohne HCl und ca. 18°	Quellungsgrad bei 0,0005 n-HCl und ca. 4°	Quellungsgrad bei 0,005 n-HCl und ca. 4°	Quellungsgrad bei 0,005 n-HCl und ca. 18°
0	1,066	53,082	59,093	182,309
0,005 n	0,038	52,686	60,776	—
0,01 „	0,014	55,474	61,873	188,713
0,02 „	0,004	55,171	63,709	184,417

Gleich negativ verlief auch die Viscositätsuntersuchung im Autoklaven abgebauten salzfreien Glutins, das überwiegend aus Glutose und Peptonen bestand.

Tabelle XVII.

Die Versuchstemperatur betrug 25°.

Eiweiß	Salzsäurekonzentration	Kein Coffeinzusatz	Mischung: Eiweiß–HCl–0,02n-Coffein	
			beobachtet	berechnet
1% Glutin 1h im Autoklaven bei 120° abgebaut	0 0,02 n	1,1148 1,1564	— 1,1648	— 1,1645
1% Glutin 10h im Autoklaven bei 143° abgebaut	0 0,02 n	1,0283 1,0216	— 1,0316	— 1,0297

Ebenso wie beim Glutin war auch die am Fibrin (Merck) vorgenommene Prüfung der Coffeinwirkung negativ. Hier diente als Methode die von M. H. Fischer verwendete Höhenmessung der Säule gequollenen Fibrins. Bei Eindringen gleicher Fibrin-

mengen in verschiedene Säurelösungen erfährt das Volumen des Fibrins eine gewaltige Erhöhung, die durch Coffeinzusatz nicht erkennbar vermehrt wird. Ebenso war die mittels der Reibungsmessung bestimmte Hydratation einer aus Fibrin gewonnenen Protalbumose durch Coffein oder Theophyllin nicht zu beeinflussen. Auch die geringe Hydratation des Alanins durch Säure erweist sich durch Coffein als unberührt. Bezüglich dieser Versuche siehe die folgende Tabelle XVIII.

Tabelle XVIII.

Abbau-produkt	Salz-säure-konzen-tration	Kein Coffein	Mischung: Abbauprodukt + Salzsäure + Coffein		Theophyllin	
			beob-achtet	berechnet	beob-achtet	berechnet
1 % Protalbu-mose aus Witte-Pepton	0	1,0599	—	—	—	—
	0,02 n	1,0965	1,1049	1,1049	1,1064	1,1065
1 % Alanin	0,02 n	1,0333	1,0399	1,0399	—	—

III.

Über die Natur der Coffeinwirkung sind von vornherein verschiedene Vorstellungen möglich. So wäre es denkbar, daß durch das Coffein eine gesteigerte Säurebindung an das Eiweiß und dadurch die in der Viscositätserhöhung ausgedrückte Hydratation zustande käme. Dies könnte etwa in der Weise erfolgen, daß das Coffein durch Besetzung saurer Gruppen im Eiweiß verdeckte Aminogruppen reaktionsfähig macht, wie dies in umgekehrter Weise für die Freimachung von Carboxylgruppen durch Reaktion von Formaldehyd mit Aminogruppen angenommen wird. Wir kennen ein sehr brauchbares Maß für die Säurebindung an das Eiweiß in der elektrischen Leitfähigkeit der Säure-Eiweißkombination. Durch die Wegbindung der freien Wasserstoffionen bei Eiweißzusatz zu einer starken Säure findet entsprechend der Konzentrationsabnahme der freien Wasserstoffionen eine Verminderung der elektrischen Leitfähigkeit statt, denn die neugebildeten Eiweißionen besitzen nach den bisherigen Beobachtungen eine Beweglichkeit, die etwa $^1/_{15}$ von der des Wasserstoffes betragen dürfte. Eine durch das Coffein vermittelte Bindung von Wasserstoffionen

an das Eiweiß müßte sich durch eine zugehörige weitere Abnahme der Leitfähigkeit verraten. Die nach der Kohlrauschschen Methode vorgenommenen Messungen der Leitfähigkeit bei 25° haben jedoch ergeben, daß irgendeine nennenswerte Mehrbindung der Wasserstoffionen an das Eiweiß durch den Coffeinzusatz nicht erfolgen kann, da die durch Coffeinanwesenheit bewirkte sehr geringe Abnahme der Leitfähigkeit von Säureeiweiß in befriedigender Weise mit der bei reiner Salzsäure durch das Coffein bewirkten zusammenfällt. Die Leitfähigkeitsversuche sind in der folgenden Tabelle XIX enthalten.

Tabelle XIX.

Die Platinelektroden des Leitfähigkeitsgefäßes, dessen Kapazität zu 13,4695 am Anfang und Ende des Versuches bestimmt wurde, waren zur Verhütung der Adsorption mit nach Wetham schwach geglühtem Platinmoor überzogen.

Konzentration	Spezifische Leitfähigkeit	Durch das Coffein bewirkte prozentuale Depression
0,02 n-HCl	0,0079144	—
0,02 n-HCl + 0,02 n-Coffein	0,0077810	1,69
0,02 n-HCl + 0,8 % Serum	0,0046574	—
0,02 n-HCl + 0,8 % Serum + 0,02 n-Coffein . . .	0,0045203	2,94

Durch Zusatz von Salzsäure zu Serum wurde eine Depression von 41,15 % bewirkt.

In dem gleichen Sinne fielen die auf anderem Wege gewonnenen Ergebnisse über die bei Coffeinzusatz bestehende Säurebindung an das Eiweiß aus. Es ist in neuerer Zeit Pauli und Samec gelungen, mit Hilfe eines Celloidinosmometers gut reproduzierbare Werte für den osmotischen Druck von Eiweißlösungen zu erzielen. Versetzt man Eiweiß mit Säure, so kommt es zu einer ganz bedeutenden osmotischen Drucksteigerung, die das 5fache und mehr der vom neutralen Eiweiß ausgeübten Druckwirkung betragen kann. Die Drucksteigerung hängt damit zusammen, daß durch die z. B. bei Salzsäureeinwirkung erfolgende Bildung eines mehrwertigen Eiweißchlorides nicht nur die kolloiden Eiweißteilchen, sondern auch die durch elektrostatische Kräfte gebundenen Chlorionen, die im Osmometer festgehalten werden, osmotisch wirksam

werden. Auf diese Weise erfolgt durch Säurezusatz zum Eiweiß eine das mehrfache des Ausgangswertes erreichende osmotische Drucksteigerung, die zugleich als Maß für die Säurebindung an das Eiweiß dienen kann. Osmotische Druckbestimmungen von Säureeiweiß bei Coffeinanwesenheit ergaben nun, daß eine durch osmotische Drucksteigerung erkennbare Vermehrung der Säurebindung an das Eiweiß bei Coffeinzusatz nicht erfolgt. Auf dieses Ergebnis muß um so mehr Gewicht gelegt werden, als es sich hier um eine Methode von großer Empfindlichkeit handelt. Wir dürfen auch nach diesen Versuchen die Vorstellung, daß durch das Coffein eine gesteigerte Bindung von Säure an das Eiweiß vermittelt wird, als nicht in den Tatsachen begründet ablehnen.

Schließlich wurde mit Hilfe der elektrometrischen H- und Cl-Ionenmessung festgestellt, daß durch Coffeinzusatz keinerlei Änderung in den Konzentrationsverhältnissen der freien und gebundenen H- und Cl-Ionen im Säureeiweiß erfolgt. Die Messungen geschahen mit Hilfe eines von Pauli[1]) technisch vervollkommneten Hasselbalchschen Apparates und der von K. Manabe und J. Matula am Institute ausgearbeiten Cl-Ionenbestimmungsmethode, die sich in jeder Hinsicht bewährt haben. Die durchaus eindeutigen Resultate finden sich in der folgenden Tabelle.

Tabelle XX.

Endkonzentration des Serumeiweißes 1%. Versuchstemperatur 20°. π sind die elektromotorischen Kräfte, die bei unserer Anordnung auf 0,2 bis 0,4 Millivolt reproduzierbar waren, p_H Sörensens H-Ionenexponent, C_H die freien, C'_H die gebundenen H-Ionen. Die Reihen stimmten absolut überein.

Mischung	$\pi_{1,75}$	$\pi_{3,5}$	π	p_H	C_H	C'_H
0,02 n-HCl-Serumeiweiß	0,394	0,397	0,400	2,0155	0,009648	0,009516
0,02 n-HCl-Eiweiß + 0,02 n-Coffein	0,394	0,397	0,400	2,0155	0,009678	0,009516

Nach diesen Ergebnissen lag es nahe, auf die schon früher von Pauli angedeutete Vorstellung zurückzukommen, daß es bei der Coffein-Säurewirkung auf das Eiweiß zur Bildung eines

[1]) Zu beziehen durch F. Köhler in Leipzig. Näheres bringt die Arbeit von K. Manabe und J. Matula.

komplexen Salzes von stärkerer Hydratation der Ionen, verglichen mit der des reinen Säurealbumins, kommen könnte. Für diese Auffassung konnte ins Treffen geführt werden, daß das Coffein und seine Verwandten überhaupt zur Bildung von Doppelsalzen und Komplexsalzen sehr geneigt sind, wobei es im allgemeinen zu einer innigeren Wechselbeziehung mit dem Lösungsmittel kommen dürfte, wie schon die Steigerung der Löslichkeit bei diesen Doppelsalzen gegenüber den einfachen Verbindungen wahrscheinlich macht. Die Frage, wie groß die in das Eiweiß eintretende Coffeinmenge ist, ob es sich um die Bildung eines Doppelsalzes Coffeinchlorid-Albuminchlorid oder Coffein-Albuminchlorid handelt, ist einstweilen nach unseren Versuchen eine offene geblieben. Doch sprechen dieselben mehr in dem Sinne, daß das Coffein allein in das Eiweißchlorid eintritt. Zugunsten dieser Anschauung waren zunächst die obigen Versuche zu verwerten, nach denen durch Coffeinzugabe keine nennenswerte weitere Bindung von Säure an Eiweiß so wenig wie von Säure an das Coffein erfolgt. Ferner stehen nach den Erfahrungen bei der Reaktion von Säureeiweiß mit Neutralsalzen im Säureeiweiß wohl reichlich Möglichkeiten für den Eintritt von Kationen in Carboxylgruppen, oder an Stelle von Imidwasserstoff, nicht so leicht aber von Anionen zur Verfügung. Daß das Coffein als Kation mit dem Eiweiß reagiert, dürfte bei der vorhandenen stark sauren Reaktion und bei dem Fehlen jeder Coffeinwirkung mit Alkalieiweiß[1]) kaum zu bezweifeln sein.

Für die große Differenz im Verhalten von Albumin auf der einen Seite, und Glutin und Fibrin auf der anderen Seite, welche letzteren die Hydratationswirkung durch das Coffein ganz vermissen lassen, kämen von vornherein verschiedene Möglichkeiten in Betracht, die im allgemeinen in zweifacher Richtung sich bewegen. Erstens, daß der Coffeineintritt nicht an die Anwesenheit von reaktionsfähigen sauren Gruppen überhaupt gebunden ist, sondern nur an solche in einer bestimmten Konfiguration erfolgt, die eben nur beim Albumin realisiert wäre; oder zweitens, daß die Hydratation der komplexen Salze bei den verschiedenen Eiweißkörpern in einem verschiedenen Ver-

[1]) Handovsky, diese Zeitschr. 25, 538.

hältnis zur Hydratation der reinen Säureproteine steht. Soweit das vorhandene Material reicht, läßt sich die zweite Ansicht leichter begründen. Einerseits sind erhebliche Unterschiede in der Zusammensetzung sowohl zwischen Albumin und Glutin als auch zwischen Glutin und Fibrin vorhanden, andrerseits erscheinen Glutin und Fibrin, bei denen die Coffeinwirkung fehlt, durch das gemeinsame Merkmal einer ganz gewaltigen Hydratationsfähigkeit schon unter dem Einflusse sehr schwacher Säuren verbunden. Demnach wäre es denkbar, daß die Hydratation der einfachen Salze des Glutins und des Fibrins bereits eine so bedeutende ist, daß sie bei der Entstehung höherer Komplexe keiner weiteren Steigerung fähig ist. Diese hier mit allem Vorbehalt gegebene Ansicht, so wahrscheinlich sie auch erscheint, wird noch durch fortgesetzte Versuche zu prüfen sein.

Über Fermentwirkung und deren Beeinflussung durch Neutralsalze. II.

Von

E. Starkenstein.

(Aus dem pharmakologischen Institut der deutschen Universität in Prag und der physiologisch-chemischen Abteilung der zoologischen Station in Neapel.)

Ausgeführt mit Unterstützung der „Gesellschaft zur Förderung deutscher Wissenschaft, Kunst und Literatur in Böhmen".

(Eingegangen am 7. November 1912.)

Mit 2 Figuren im Text.

Frühere Untersuchungen[1]) über die Rolle der Neutralsalze bei der Diastasewirkung hatten unter anderem ergeben, daß gewissermaßen für eine bestimmte Anzahl von Diastasemolekülen auch eine entsprechende Anzahl von Salzmolekülen notwendig ist, um eine maximale Fermentleistung zu erzielen. Der aktivierende Teil des Salzes ist das Anion und zwar nur das Cl- und Br-Ion (Wohlgemuth, Bierry), während andere Ionen gar nicht oder nur sehr schwach wirkend sind. Auf Grund meiner früheren Befunde von dem direkt proportionierten Verhältnis von Salzmenge zur Diastasemenge wurde es eigentlich erst ermöglicht, von den tatsächlich vorhandenen Fermentmengen richtige Vorstellungen zu bekommen; denn die meist angewendeten Methoden zur quantitativen Diastasebestimmung geben nur eine Vorstellung von der Fermentmenge der zu prüfenden Lösung unter den jeweilig obwaltenden (Temperatur, Salzgehalt usw.) aber nicht optimalen Bedingungen. Bei Einhaltung gleicher Bedingungen ist es auf diese Weise möglich Fermentlösungen untereinander zu vergleichen. In dieser

[1]) Starkenstein, Über Fermentwirkung und deren Beeinflussung durch Neutralsalze. Diese Zeitschr. 24, 210, 1910.

Hinsicht werden wohl richtige relative Werte erhalten werden, ein absolutes Maß für tatsächlich vorhandene Fermentmengen stellen die gewöhnlichen Methoden aber nicht dar. Die Schätzung der gesamten Fermentmenge wird möglich, wenn man die Ergebnisse meiner früheren Untersuchungen mit einer der bekannten Methoden kombiniert.

Wie bereits früher ausgeführt wurde, ist hierzu in erster Linie notwendig, statt mit Preßsäften mit Wiechowskischen Organpulvern zu arbeiten. Man bestimmt das Gesamtgewicht des betreffenden Organs in trockenem Zustande und stellt dann Organplasmen von bestimmter Konzentration her. Hierdurch wird ein stets gleichbleibender Vergleichswert geschaffen, der beim Arbeiten mit Preßsäften nur schwer, oft überhaupt nicht zu erreichen ist.

Nach der Methode Wohlgemuths, derjenigen, mit welcher ich die Versuche ausgeführt habe, wird nun z. B. ein bestimmter Wert erhalten. Durch Dialysieren der Lösung gegen destilliertes Wasser wird dieser Wert auf Null gebracht, und diese Lösung kann erst die Ausgangslösung für die weiteren Untersuchungen darstellen. Bei Zusatz steigender Mengen von Kochsalz wird man zunächst Werte erhalten, die bis zu einem gewissen Punkte ansteigen und dann bei weiterem Zusatze von NaCl wieder abnehmen. Dabei wird der Wert, den die native Lösung vor der Dialyse besaß, bald überschritten sein. Wir können uns diese Erscheinung so vorstellen, daß die physiologisch vorhandene Salzmenge nur ausreicht, eine bestimmte Menge der vorhandenen Fermentmenge zu aktivieren. Durch weiteren Zusatz jedoch erreicht man ein Maximum. Wird nach Überschreiten dieses Maximums noch mehr Salz zugesetzt, so wird eine Salzkonzentration erreicht, die das Ferment bereits schädigt. Die Kurve der Salzwirkung verläuft dann so, daß sie zunächst vom O-Punkt ausgehend ein Maximum erreicht und dann wieder gegen den O-Punkt zu abfällt (Fig. 1). Wenn man aber nach Erreichung der maximalen Wirkung die Lösung mit der steigenden Salzmenge entsprechend verdünnt, derart, daß die optimale Salzkonzentration erhalten bleibt, so verläuft die Kurve vom Punkte des Optimums in einer Geraden (Fig. 2). Die optimale Leistung ist von der Fermentkonzentration unabhängig.

Daß diese Erfahrungen zur zuverlässigen Schätzung der

Fermentmenge einer Lösung verwendet werden können, beweist folgendes Beispiel. Wir hatten von den Leberpulvern zweier Tiere je $5^0/_0$ige Organplasmen hergestellt. Die Diastasemenge beider Lösungen wird nach Wohlgemuth bestimmt und gibt nahezu übereinstimmende Werte. Wenn wir aber die Fermentlösung dialysieren und dadurch bis zum O-Punkt inaktivieren, nachher die Bestimmung bei zunehmendem Salzgehalt wiederholen, so kann man finden, daß das Maximum der Fermentwirkung der ersten Lösung bei Zusatz einer Salzmenge X erreicht wird (das Maximum liegt meist höher als der Wert der nativen Lösung). Zur Erreichung des Maximums der zweiten Lösung ist aber die Salzmenge 2 X notwendig, und damit wird ein doppelt so hoher Wert erreicht. Wenn wir also die Fermentmenge bestimmen wollen, müssen wir die betreffende Lösung zunächst inaktivieren und dann erst durch Zusatz entsprechender Salzmengen auf ein Maximum der Wirkung bringen.

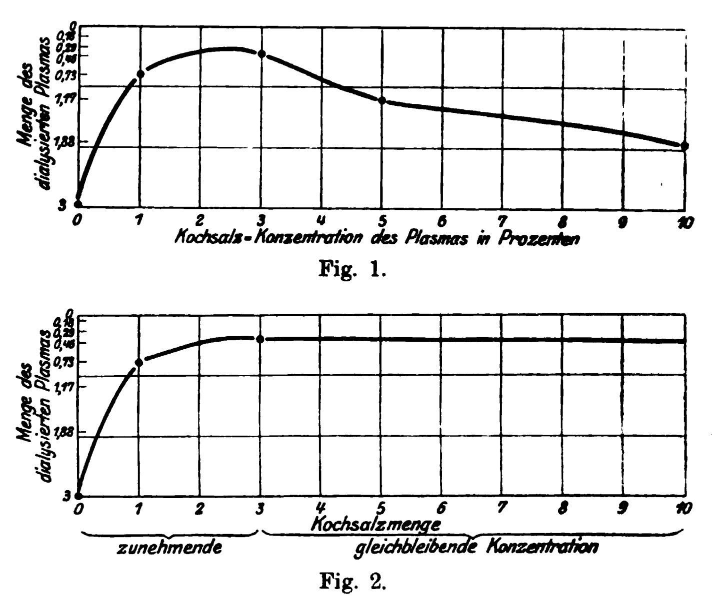


Fig. 1.

Fig. 2.

Über die Art und Weise, wie diese Aktivierung des Diastasemoleküls zustande kommt, wissen wir nur folgendes: Die Aktivierung ist unabhängig von der Konzentration der Lösungen, abhängig aber von der absoluten Menge des vorhandenen Salzes und von der Art des Elektrolyten.

Auf Grund der früheren Befunde hatte ich seinerzeit vermutet, daß durch Verbindung des Cl-Ions mit dem Diastasemolekül eine besser wirkende Verbindung geschaffen wird. Diese Anschauung wird durch neuerliche Versuche Bangs[1]) gestützt.

Während ich bei meinen Versuchen zunächst mehr zur Orientierung mit größeren Salzmengen arbeitete und damit nur grobe Grenzwerte bekam, hat Bang ähnliche Versuche mit Speicheldiastase ausgeführt und hierbei ganz geringe Salzmengen zugesetzt, so daß die oben mitgeteilten Resultate, speziell die Kurven der Fermentwirkung, noch deutlicher, jedoch vollkommen gleichsinnig mit den meinigen ausfielen.

Einen weiteren Anhaltspunkt zur Unterstützung der aufgestellten Theorie boten ihm Resultate, die er bei Zusatz von Phosphaten zur Fermentlösung erhalten hatte. Durch Dialyse allein gelingt es wohl, eine Lösung soweit zu inaktivieren, daß für die Methode der Diastasebestimmung nach Wohlgemuth wohl der 0-Punkt erreicht wird, doch wird dabei immer noch etwas Zucker gebildet. Eine vollständige Inaktivierung erreicht Bang durch Zusatz von Natriumphosphat und nachheriger Dialyse. Bang erklärt sich diesen Vorgang wiederum so, daß das Phosphat gewisse reversible Änderungen des aktiven Diastasemoleküls bewirkt. Die Reversibilität wird durch die Reaktivierung durch Kochsalz bewiesen.

Die einzige Erklärung, die die Reaktivierung durch Kochsalz und den Gegensatz zwischen Phosphat und Chlorid überhaupt verständlich machen kann, sieht Bang darin, daß das aktive Diastasemolekül mit NaCl eine dissoziable Verbindung bildet. Bei der Dialyse wird ein Teil des abdissoziierten NaCl entfernt, der Rest wird aber energisch von dem Diastasemolekül zurückgehalten und dialysiert nicht gleich fort. Setzt man aber überschüssiges Natriumphosphat hinzu, so setzt sich dieses größtenteils mit der Diastase-NaCl-Verbindung um und es entsteht eine inaktive Diastase-Phosphatverbindung. So lange sich aber noch NaCl in der Lösung befindet, hält es trotz des Überschusses von Phosphat die Fermentlösung aktiv, weil die Affinität des Fermentmoleküls zum NaCl größer ist als zum Phosphat. Diese Befunde Bangs bestätigen so neuerdings

[1]) Bang, Über Diastasen I. Diese Zeitschr. 32, 417, 1911.

die Bedeutung des Cl-Ions für die Diastase und unterstützen auch die früher von mir geäußerte Anschauung über die Art dieser Aktivierung.

Alle diese Untersuchungen erstrecken sich auf tierische Diastasen. Auffallenderweise soll nach neueren Mitteilungen von Bierry[1]) die Gegenwart von Neutralsalzen als Aktivatoren nur für tierische Diastasen von Bedeutung sein, während es nach den Befunden der genannten Autoren nicht gelingen soll, Pflanzendiastase durch Dialyse zu inaktivieren.

Mit diesen Befunden im Widerspruch steht eine Angabe von Fränkel und Hamburg[2]). Diese hatten bei Untersuchungen über Pflanzendiastase beobachtet, daß dieselbe schon nach 12stündiger Dialyse ihre Wirkung vollständig oder doch zum größten Teil einbüßt.

Mit Rücksicht auf diese widersprechenden Resultate habe ich einige derartige Versuche ausgeführt: Ich habe eine Lösung von Pflanzendiastase eine Zeit lang dialysiert und hierauf in 2 Teile geteilt. Jeder der beiden Teile erhielt nun die gleiche Menge Stärke zugesetzt, der eine außerdem so viel Kochsalz, daß der Gehalt der Lösung an NaCl 2⁰/₀ betrug. Die Proben wurden dann in den Brutschrank gestellt. Nach 2 Stunden betrug der Zuckergehalt der dialysierten Lösung 0,08⁰/₀, der mit Kochsalz versetzten dagegen 0,3⁰/₀. Ein zweiter Versuch fiel ähnlich aus. Eine vollständige Inaktivierung war allerdings auch hier nicht erfolgt, doch zeigte sich deutlich die hemmende Wirkung der Dialyse und der fördernde Einfluß des Kochsalzes. Daß aber die Verhältnisse hier nicht anders sind als bei der tierischen Diastase, das beweist ein nach der Wohlgemuthschen Methode durchgeführter Versuch, der in Tabelle XVIII mitgeteilt ist. Der zur Dialyse verwendete Kollodiumschlauch wurde auf eventuelle Durchlässigkeit für Diastase geprüft, erwies sich jedoch für die untersuchte Diastase als vollkommen undurchlässig.

Es ergibt sich somit aus diesen Versuchen, daß zwischen

---

[1]) Bierry, Die Rolle der Elektrolyte bei der Wirkung einiger tierischer Fermente. Diese Zeitschr. 40, 357, 1912.

[2]) Fränkel und Hamburg, Über Diastasen. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 389, 1906.

tierischer und pflanzlicher Diastase hinsichtlich ihrer Beziehung zu den Neutralsalzen kein Unterschied besteht.

Bei früheren Untersuchungen über das Glykogen der Tunikaten[1]) hatte ich beobachtet, daß bei einer Temperatur von 10° das Glykogen in den Organen dieser Tiere in kürzester Zeit zu Zucker hydrolisiert wurde. Dies bewies das Vorhandensein eines äußerst leistungsfähigen Fermentes, wie es in gleicher Stärke in den Warmblüterorganen nicht nachgewiesen werden konnte. Es ist ja naheliegend, daß die Fermente der Kaltblüter bei einer niederen Temperatur wirken müssen als die der Warmblüter. Die erhöhte Leistungsfähigkeit könnte zustande kommen durch eine andere Art der Aktivierung oder, was wahrscheinlicher wäre, durch eine größere Fermentmenge. Bei Untersuchung dieser Fragen konnten nun zwei Wege eingeschlagen werden: Zuerst vergleichende Untersuchungen über den Fermentgehalt gleicher Organe von Warm- und Kaltblütern. Der zweite Weg basiert auf den Erfahrungen über die Bedeutung der Salze für die Fermentwirkung. Es wäre nicht unmöglich, daß dieser Faktor besonders bei den Seetieren von Bedeutung sei, indem hier gewisse Beziehungen bestünden zwischen der Leistungsfähigkeit der Diastase dieser Tiere und dem Milieu, in dem sie leben.

In dieser Richtung bewegten sich meine weiteren Untersuchungen. Die angewandte Methodik war dieselbe wie in den früheren Arbeiten. Als Einheit der diastatischen Kraft (D) für eine bestimmte Temperatur und Zeit der Einwirkung bezeichne ich in Anlehnung an Wohlgemuth unter Berücksichtigung des geänderten Ausgangsmaterials jene Anzahl von Kubikzentimetern einer 0,5 $^0/_0$ igen Stärkelösung, die von 1 g des betreffenden Organpulvers hydrolysiert werden.

Als erste vergleichende Versuche habe ich 5 $^0/_0$ ige Organplasmen von Frosch- und Menschenlebern auf ihre diastatische Kraft geprüft. Die Versuche wurden zunächst bei 20°, dann bei 30° ausgeführt. Sie ergaben für das Froschleberplasma bei einer Digestionsdauer von 6 Stunden und bei 20° eine dia-

[1]) Starkenstein, Über den Glykogengehalt der Tunikaten nebst Versuchen über die Bedeutung des Eisens bei der quantitativen Glykogenbestimmung. Diese Zeitschr. 27, 53, 1910.

statische Kraft D = 53, während das gleich konzentrierte Menschenleberplasma unter den gleichen Bedingungen überhaupt noch nicht hydrolysierte, also D = 0 war. Bei höherer Temperatur glich sich dieser Unterschied allmählich aus. Der Endeffekt war hierbei in allen Fällen der gleiche, nur wurde er vom Froschplasma früher erreicht als von dem der Menschenleber.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß es wahrscheinlicher ist, daß die Unterschiede in der Wirkung von Kalt- und Warmblüterorganen nicht in der Aktivierung durch verschiedene Temperatur gelegen sind, sondern in verschiedenem Gehalt an Ferment. Dafür spricht am besten das Verhalten des Menschenspeichels. Dieser stellt die höchst wirksame Diastaselösung dar, die wir überhaupt als natürliches Sekretionsprodukt kennen. Entsprechend seinem hohen Gehalt an Diastase ist er auch imstande, bei sehr niedriger Temperatur unendlich große Mengen von Stärke zu hydrolysieren. An dem Vergleich der Wirkung von Menschenspeichel und Menschenleberplasma geht hervor, daß zum Studium von Kalt- und Warmblüterfermenten stets gleichnamige Organe herangezogen werden müssen, und diesbezügliche Versuche ergaben, daß man in Kaltblüterorganen im allgemeinen eine höhere Fermentkonzentration annehmen kann als in gleichnamigen Organen der Warmblüter. (Vgl. Tabelle I bis III.)

Von größerem Interesse waren Versuche an Seetieren, besonders an solchen, bei denen die Körperflüssigkeit isotonisch dem Seewasser ist.

Für derartige Untersuchungen müssen wir die Seetiere in 3 Gruppen einteilen:

1. Wirbellose: Das Blut derselben ist isotonisch dem Seewasser; die Isotonie ist durch gleichen Salzgehalt bedingt.

2. Selachier: Das Blut derselben ist ebenfalls dem Seewasser isotonisch, doch ist die Isotonie nur ungefähr zur Hälfte durch Salze, zur Hälfte durch Harnstoff hergestellt.

3. Teleostier: deren Blut dem Seewasser hypotonisch ist; doch ist der Salzgehalt ihres Blutes immerhin noch höher als der der Warmblüter.

Für die Versuche habe ich stets, wie bei den Warm-

blütern, die Lebern verwendet. Die Leber wurde nach dem Verfahren Wiechowskis durch ein Drahtsieb passiert, dann auf Glasplatten gestrichen, rasch an der Luft getrocknet und vom Trockenpulver ein $5\,^0/_0$iges Organplasma hergestellt. Von Tieren der ersten Gruppe (Wirbellose) verwendete ich Aplysien (Aplysia punctata und limacina), ferner Eledone, Octopus und Tunikaten.

Die ersten Versuche mit $5\,^0/_0$igem Aplysienleberplasma, die ich bei 15° und bei 37° durchgeführt habe, hatten mir gezeigt, daß hier so viel Ferment vorhanden ist, daß der Endpunkt der Reaktion in viel kürzerer Zeit erreicht wird. Ich habe daher weiterhin 10fach verdünnte Plasmen, also $0{,}5\,^0/_0$ige, verwendet. Die Versuche in Tab. XII und XIII beweisen, daß in den Lebern dieser Tiere eine ganz außerordentlich hohe Konzentration an diastatischem Ferment vorhanden ist, und daß durch Zusatz von Salz oder, wie ich es tat, bei Verwendung von Seewasser statt des destillierten Wassers als Lösungsmittel, Werte von $D = 10000$ erreicht wurden, die aber noch nicht das Maximum darstellen. Um eine annähernde Vorstellung von der tatsächlich vorhandenen Fermentmenge zu bekommen, habe ich nun die Fermentlösung dialysiert und aufsteigende Mengen von Kochsalz zugesetzt. Während in einem $5\,^0/_0$igen Organplasma einer Kaninchenleber mit einem Salzgehalt von $3\,^0/_0$ bereits das Optimum der Fermentwirkung erzielt wurde, höhere Salzkonzentration aber schon schädigt, ist hier zur Erreichung optimaler Verhältnisse eine viel höhere Salzkonzentration des Plasmas erforderlich, und selbst bei $20\,^0/_0$ Kochsalz (vor Zusatz der Stärke) treten noch keine Schädigungen auf. Ohne daß wir dadurch einen absoluten Fermentgehalt festgestellt hätten, da die Endreaktion noch lange nicht erreicht war, beweist doch das relative Verhältnis zur Kaninchenleber, wie unendlich höher die Diastasekonzentration in den Organen der wirbellosen Seetiere sein muß.

Ich habe weiterhin aus der gleichen Gruppe die Lebern von Cephalopoden untersucht und ähnliche Werte gefunden[1]).

---

[1]) Ich möchte bei dieser Gelegenheit auf ein Moment aufmerksam machen, das methodisch beim Arbeiten mit den Lebern dieser Tiere

Von Tieren der zweiten Gruppe wurde Scyllium catulus untersucht. Was die absoluten Werte für den Diastasegehalt der Leber dieser Tiere betrifft, so sind diese äußerst gering, und es ist anzunehmen, daß die Diastasewirkung durch die große Fettmenge nachteilig beeinflußt wird. Was in den angeführten Versuchen dieser Gruppe jedoch von Bedeutung ist und auch klar zum Ausdruck kommt, das ist der Einfluß der Blutzusammensetzung auf die Wirkung der Diastase.

Wie erwähnt, ist die Isotonie des Blutes dieser Tiere mit Seewasser durch Kochsalz und Harnstoff hergestellt. Ich habe daher auch hier die Organplasmen dialysiert und dann mit so viel Kochsalz und Harnstoff versetzt, daß annähernd jene Konzentrationen erreicht wurden, die dem Blute der Selachier entsprechen. Durch Zusatz von Kochsalz allein wurde die durch Dialyse inaktivierte Diastase wohl auch reaktiviert, doch nur bis zu einem gewissen Grade. Setzt man einem Kaninchenleberplasma, dessen Diastase bestimmt wurde, 2 % Harnstoff zu, so erfährt die Diastasewirkung entweder keine Änderung oder bisweilen sogar eine Schädigung. Demgegenüber wird die diastatische Leistungsfähigkeit eines Scylliumleberplasmas durch Harnstoffzusatz deutlich gefördert. Zur Aktivierung ist jedoch nicht Harnstoff allein fähig, denn eine Reaktivierung von dialysiertem Scylliumleberplasma durch Harnstoff allein gelingt nicht, wohl aber vermag Harnstoff die durch Kochsalz reaktivierte Lösung in ihrer Wirkung in nennenswerter Weise zu steigern (Tab. VII bis XI).

Daß Harnstoff für physiologische Funktionen der Haifische von Bedeutung ist, hat schon Baglioni gefunden. Wenn er Herzen von Selachiern mit für das Blutserum der Selachier

von Bedeutung ist. Wenn man nämlich die Lebern der Cephalopoden in toto trocknet, dann das Pulver in Wasser suspendiert und nach 2stündigem Stehen, wie das in der Regel bei den Organen niedriger Tiere geschieht, filtriert, so bekommt man ein klares, fast eiweißfreies Filtrat, das auch außerordentlich arm an Fermenten ist. Die Ursache für diese Erscheinung dürfte darin gelegen sein, daß beim Trocknen auch der Inhalt des Tintenbeutels mitgetrocknet wurde, der wegen seiner großen Adsorptionskraft die Eiweißkörper und Fermente an sich reißt und so dem Organplasma entzieht. Es muß daher beim Verarbeiten dieser Tiere stets darauf geachtet werden, daß der Tintenbeutel unverletzt bleibt und nur reines Lebergewebe betrocknet wird.

isotonischen Lösungen durchspülte, wovon die eine 3,5 g NaCl auf 100 ccm Leitungswasser, die andere 2 g NaCl + 2,2 g Harnstoff auf 100 ccm Leitungswasser enthielt, so unterhielt nur die letztere Lösung die Lebenstätigkeit des Herzens.

Als Vertreter der dritten Gruppe, der Teleostier, wurde noch die Leber von Labrus festivus unter gleichen Bedingungen wie der anderen Tiere untersucht. Die Werte für die diastatische Kraft derselben sind bedeutend niedriger (Tab. XVII).

Wenn wir die bisherigen Versuche überblicken, so läßt sich unschwer eine gewisse Beziehung zwischen der Stärke der diastatischen Wirkung bei diesen Tieren und der Blutzusammensetzung erkennen. Von allen untersuchten Tieren zeigten diejenigen den höchsten Diastasegehalt, die auch den größten Salzgehalt im Blute besitzen: die Wirbellosen. Bedeutend niedriger ist der der Teleostier und der Haifische. Bei den letzteren kommt dem Harnstoff ein wesentlicher Anteil an der Blutzusammensetzung zu, und er ist auch für die Diastasewirkung von großer Bedeutung.

Bei der Beurteilung des hohen Fermentgehaltes in der Leber der wirbellosen Seetiere wird auch zu berücksichtigen sein, daß das Organ, das hier als Leber bezeichnet wird, nicht ganz der Wirbeltierleber entspricht. Es ist hier von der eigentlichen Leber das Pankreas nicht zu trennen, und beide werden daher als Hepatopankreas bezeichnet. Dies ist aus dem Grunde zu berücksichtigen, weil ja auch das Pankreas der Säugetiere mehr Diastase enthält als die Leber. Die hohen Werte, die in der Literatur über Pankreasdiastase mitgeteilt sind, beziehen sich meist auf Preßsäfte. Bei Verwendung von Organpulvern dagegen konnte ich niemals derart hohe Werte erhalten wie bei den Organen der Wirbellosen.

Wie eingangs erwähnt, ist es als selbstverständlich anzusehen, daß die Fermente der Kaltblüter bei einer niedrigeren Temperatur arbeiten müssen als die der Warmblüter, und es scheint die höhere Leistungsfähigkeit durch höhere Konzentration des Fermentes bedingt zu sein.

Über die optimale Temperatur für Fermente der Kaltblüter bestehen eine Reihe meist einander widersprechende Angaben, und es scheint, daß diese Widersprüche darauf zurück-

geführt werden können, daß stets verschieden fermentreiche Organe untersucht wurden. Während z. B. das uricolytische Ferment der warmblütigen Säugetiere bei ca. 40° eine optimale Wirkung entfaltet, konnte Scaffidi schon bei viel niedrigerer Temperatur maximale Leistungen mit dem uricolytischen Fermente von Scyllium erzielen. Der Unterschied ist ebenfalls in verschiedener Konzentration gelegen. Hinsichtlich des Temperaturoptimums für die Wirkung des Pepsins, von dem im allgemeinen dasselbe gilt wie von den anderen beschriebenen Fermenten, vgl. Polimanti[1]).

Die in den Tabellen VII und VIII mitgeteilten Versuche wurden derart ausgeführt, daß sowohl auf die Salzkonzentration als auch auf die Temperatur Rücksicht genommen wurde. Es ergaben diese Versuche folgendes:

Organe wie die Leber der Kaninchen und ähnliche, die keine besonders hohe Konzentration an Diastase besitzen, brauchen höhere Temperaturen, um eine nennenswerte Fermentleistung zu erzielen. Bei Organen mit hohem Ferment- und entsprechend hohem Salzgehalt wird im allgemeinen bei niedriger Temperatur derselbe Endeffekt erzielt wie bei hoher (Tab. VII und VIII). Ist der Salzgehalt ein besonders hoher, so kann sogar bei niederer Temperatur ein größerer Effekt erzielt werden als bei hoher. (Es wäre an die Möglichkeit zu denken, daß durch die hohe Salzkonzentration bei hoher Temperatur bereits eine Schädigung des Eiweißes erfolgt.)

Besonders instruktiv gestaltete sich für die Frage der Temperaturoptima der in Tab. XVI wiedergegebene Versuch. Es wurden 8 vollkommen gleiche Versuche angestellt und 4 davon bei 15°, 4 bei 37° durchgeführt. Je ein Versuch wurde immer nach 3 Stunden unterbrochen und die bereits erzielte Fermentleistung bestimmt. Es zeigte sich dabei, daß von den 7 Röhrchen des Versuches bei 15° nach 3 Stunden nur 1 zersetzt war, nach 6 Stunden waren 5 an der Grenze, nach 9 Stunden waren die 7 ersten fast zersetzt, und damit war nahezu das Maximum erreicht, denn nach 24 Stunden waren nur um 1 Röhrchen mehr zersetzt als nach 9 Stunden.

[1]) O. Polimanti, Untersuchungen über die Topographie der Enzyme im Magen-Darmrohr der Fische. Diese Zeitschr. 38, 117, 1912.

Bei 37° dagegen war bereits in den ersten 3 Stunden nahezu das Maximum erreicht, das sich auch nach 6 und 9 Stunden nicht änderte. Nach 24 Stunden war nur 1 Röhrchen mehr zersetzt. Die Gesamtleistung bei 37° war aber sogar etwas geringer als bei 15°.

Daß das Temperaturoptimum im allgemeinen von der Konzentration der Fermentleistung abhängig und nicht etwa durch andere Unterschiede zwischen Kalt- und Warmblütern bedingt ist, das beweist das gleiche Verhalten des menschlichen Speichels.

10 ccm Menschenspeichel werden auf 1 Liter mit destilliertem Wasser verdünnt. Mit dieser Fermentlösung wird ein Versuch analog den früheren durchgeführt, und zwar bei 12, 15 und 37°. Der Effekt war der gleiche wie in dem oben beschriebenen mit der Aplysialeber. Auch hier war bei höherer Temperatur der Endeffekt früher eingetreten als bei niedriger, doch war die Gesamtleistung des Fermentes in allen drei Temperaturgraden dieselbe.

Wenn wir alle diese Versuche über die Bedeutung der Temperaturänderung für die diastatische Leistung überblicken, so ergibt sich daraus, daß durch eine höhere Konzentration eines Fermentes im allgemeinen dasselbe wie durch hohe Temperatur erreichen kann. Diese Beobachtung erklärt auch das eingangs erwähnte verschiedenartige Verhalten von Kalt- und Warmblüterorganen hinsichtlich ihrer diastatischen Kraft und zeigt auch, daß durch höhere Konzentration der Fermente bei den Poikilothermen in funktioneller Beziehung ein Ersatz geschaffen ist für die durch niedere Temperatur herabgesetzte Energie.

Zusammenfassung.

Die Menge der Salzmoleküle, die eine inaktive Diastaselösung ad maximum reaktivieren kann, ist direkt proportioniert der Fermentmenge. Diese Erfahrung ermöglicht es, den Fermentgehalt einer Lösung, bzw. eines Organs genau abzuschätzen. Zu diesem Zwecke wird das Organ getrocknet, von diesem 5%ige Plasmen hergestellt und dieselben durch Dialyse vollständig inaktiviert. Durch Zusatz steigender Mengen

von NaCl läßt sich ein Punkt der Fermentwirkung erreichen, der viel höher gelegen ist als der physiologische Wert und der auch bei weiterem Salzzusatz nicht mehr ansteigt. Wird durch weiteren Salzzusatz nicht nur die Salzmenge, sondern auch die Salzkonzentration erhöht, so erfolgt Schädigung des Ferments. Dieselbe wird aufgehoben, wenn die Lösung verdünnt wird.

Vergleichende Untersuchungen zwischen Kalt- und Warmblütern ergaben, daß gleichnamige Organe der ersteren im allgemeinen konzentriertere Diastasemengen enthalten als die der letzteren. Von Seetieren wurden Avertebraten, Selachier und Teleostier untersucht. Avertebraten, deren Körperflüssigkeit dem Seewasser isotonisch ist, besitzen den weitaus höchsten Diastasegehalt. Bei Selachiern, bei denen die Konzentration des Blutes wohl auch dem Seewasser isotonisch ist, bei denen aber die Isotonie durch Salz und Harnstoff hergestellt wird, ist der absolute Diastasegehalt bedeutend geringer; jedoch auch dem Harnstoff kommt bei der Aktivierung der Diastase dieser Tiere eine deutliche unterstützende Fähigkeit zu.

Hinsichtlich des Einflusses der Temperatur auf verschieden konzentrierte Diastaselösungen ergaben die Versuche, daß sowohl Kalt- als auch Warmblüterdiastase ohne Unterschied der Konzentration bei höherer Temperatur im allgemeinen besser wirken. Die absolute Leistungsfähigkeit ist aber von der Fermentmenge abhängig, so daß durch fermentreiche Lösungen bei niederer Temperatur dasselbe erreicht werden kann wie durch fermentärmere Lösungen bei höherer Temperatur.

Die Fermentleistung kann modifiziert werden, durch die Menge des Ferments, die Menge des Substrats, durch die Menge der aktivierenden Ionen und durch die Temperatur. Das Zusammenwirken aller dieser Faktoren ist bis zu einem gewissen Grade erforderlich, um überhaupt die Fermentwirkung sichtbar zu machen, doch kann eine Änderung des quantitativen Verhältnisses derselben zueinander auch quantitative Änderungen der Fermentwirkung zufolge haben.

Neapel-Prag, Mai 1912.

Experimenteller Teil.

Tabelle I.

Die Lebern von 8 Fröschen werden bei Zimmertemperatur im Ventilator getrocknet. Filtrat einer 5 %igen Suspension. Jedes Röhrchen wird ebenso wie in allen weiteren Versuchen mit 5 ccm einer 0,5 %igen Stärkelösung beschickt.

Versuchsdauer: 6^h bei 20° geschüttelt.

Fermentmenge	
3,00	+
1,88	+
1,17	limes
0,73	—
0,46	—
0,29	—
0,18	—

$D_{6h}^{20°} = 53$

Tabelle II.

Menschenleber 3^h post mortem. Trockenpulver. 5 %ige Suspension. Versuchsdauer: 6^h bei 20° geschüttelt.

Fermentmenge	
3,00	—
1,88	—
1,17	—
0,73	—
0,46	—
0,29	—
0,18	—

$D_{6h}^{20°} = \varnothing$

Tabelle III.

Frosch- und Menschenleberplasma wie in Tabelle I und II. Versuchsdauer: 6^h bei 30° geschüttelt.

Fermentmenge	Froschleber	Menschenleber
3,00	+	+
1,88	+	+
1,17	limes	limes
0,73	—	—
0,46	—	—
0,29	—	—
0,18	—	—
	$D_{6h}^{30°} = 53$	$D_{6h}^{30°} = 53$

Tabelle IV.

Kaninchenleberplasma 5%.
Versuchsdauer: 24^h bei 12°, bzw. 37°, öfters umgeschüttelt.

Fermentmenge	bei 12°	bei 37°
3,00	—	+
1,88	—	+
1,17	—	+
0,73	—	limes
0,46	—	—
0,29	—	—
0,18	—	—
	$D^{12^\circ}_{24\,h} = \varnothing$	$D^{37^\circ}_{24\,h} = 86$

Tabelle V.

Scyllium catulus Leberplasma 5%. Gleiche Bedingungen wie in Tabelle IV.

Fermentmenge	bei 12°	bei 37°
3,00	—	+
1,88	—	limes
1,17	—	—
0,73	—	—
0,46	—	—
0,29	—	—
0,18	—	—
	$D^{12^\circ}_{24\,h} = \varnothing$	$D^{37^\circ}_{24\,h} = 33$

Tabelle VI.

Kaninchenleberplasma dialysiert + steigender Zusatz von NaCl.
Versuchsdauer: 24^h bei 37° öfter geschüttelt.

Fermentmenge	NaCl-Gehalt				
	0%	1%	3%	5%	10%
3,00	limes	+	+	+	+
1,88	—	+	+	+	limes
1,17	—	+	+	limes	—
0,73	—	limes	+	—	—
0,46	—	—	limes	—	—
0,29	—	—	—	—	—
0,18	—	—	—	—	—
$D^{37^\circ}_{24h}$	$\varnothing$	86	139	53	33

Tabelle VII.

Scyllium catulus. Leberplasma 5 %. Dieselben Bedingungen wie in Tabelle VI.

Fermentmenge	NaCl-Gehalt 0 %	1 %	3 %	5 %	10 %
3,00	—	+	+	+	—
1,88	—	+	+	limes	—
1,17	—	limes	limes	—	—
0,73	—	—	—	—	—
0,46	—	—	—	—	—
0,29	—	—	—	—	—
0,18	—	—	—	—	—
$D^{37°}_{24h}$	∅	53	53	83	∅

Tabelle VIII.

5 %iges Leberplasma von Kaninchen und Scyllium catulus unter gleichen Bedingungen wie in Tabelle VI bzw. VII.
Dialysiert. Nachher Zusatz von 1 % NaCl und 2 % Harnstoff.

Fermentmenge	Kaninchen	Scyllium catulus
3,00	+	+
1,88	+	+
1,17	limes	+
0,73	—	+
0,46	—	limes
0,29	—	—
0,18	—	—
$D^{37°}_{24h}$	53	139

Tabelle IX.

5 %iges Leberplasma von Kaninchen und Scyllium dialysiert, nachher Zusatz von 1 % NaCl bzw. 1 % NaCl + 2 % Harnstoff.
Versuchsdauer: 24^h bei 37°, öfter geschüttelt.

Ferment-menge	Kaninchen 1 % NaCl	Kaninchen 1 % NaCl + 2 % $\overset{+}{U}$	Scyllium catulus 1 % NaCl	Scyllium catulus 1 % NaCl + 2 % $\overset{+}{U}$
3,00	+	+	+	+
1,88	+	+	+	+
1,17	+	+	limes	+
0,73	+	+	—	+
0,46	limes	limes	—	limes
0,29	—	—	—	—
0,18	—	—	—	—
$D^{37°}_{24h}$	139	139	53	139

Tabelle X.

Scylliumleberplasma 5% dialysiert.

Versuchsdauer: 24^h bei 37°.

Fermentmenge	Zusatz von 1% NaCl	Zusatz von 1% NaCl + 2% $\overset{+}{U}$
3,0	+	+
2,0	+	+
1,0	limes	+
0,5	—	+
$D^{37°}_{24h}$	50	> 200

Tabelle XI.

Scylliumleberplasma. Gleiche Bedingungen wie in Tabelle X.

Versuchsdauer: 14^h bei 37°.

Ferment-menge	Dialysiert	Dialysiert, dann Zusatz von 3% NaCl	Dialysiert, dann Zusatz von 2% $\overset{+}{U}$	Dialysiert, dann Zusatz von 3% NaCl + 2% $\overset{+}{U}$
3,0	—	+	—	+
2,0	—	—	—	+
1,0	—	—	—	—
0,5	—	—	—	—

Tabelle XII.

Aplysia limacina. 0,5%ige Lebersuspension.

Versuchsdauer: 24^h bei 15 bzw. 37°.

Fermentmenge	bei 15°	bei 37°
3,00	+	+
1,88	+	+
1,17	+	+
0,73	+	+
0,46	limes	limes
0,29	—	—
0,18	—	—
D	$D^{35°}_{24h} = 1389$	$D^{39°}_{24h} = 1389$

Tabelle XIII.

Aplysia limacina. Leberplasma 0,5 % in Aq. dest. und in Seewasser.
Versuchsdauer: 24^h bei 37 bzw. 15°.

Fermentmenge	Plasma in dest. Wasser		Plasma in Seewasser	
	15°	37°	15°	37°
3,0	+	+	+	+
2,0	+	+	+	+
1,0	+	+	+	+
0,5	limes	+	+	+
0,1	—	limes	+	+
	$D_{24h}^{15°} = 1000$	$D_{24h}^{37°} = 2000$	$D_{24h}^{15°} = > 10000$	$D_{24h}^{37°} = > 10000$

Tabelle XIV.

Aplysia limacina. Leberplasma 0,5 % dialysiert. Zusatz aufsteigender Mengen von Kochsalz.
Versuchsdauer: 24^h bei 15°.

Fermentmenge	NaCl-Gehaltplasma vor Zusatz der Stärkelösung						
	0 %	1 %	3 %	5 %	7 %	10 %	20 %
3,00	—	+	+	+	+	+	+
1,88	—	+	+	+	+	+	+
1,17	—	+	+	+	+	+	+
0,73	—	+	+	+	+	+	+
0,46	—	+	+	+	+	+	+
0,29	—	limes	+	+	+	+	+
0,18	—	—	limes	limes	+	+	+
$D_{24h}^{15°}$	∅	2174	3511	3511	> 5556	> 5556	> 5556

Tabelle XV.

Aplysia punctata. Leberplasma 0,5 % dialysiert, dann Zusatz verschiedener Mengen NaCl bei verschiedenen Temperaturen.
Versuchsdauer: 24^h.

Fermentmenge	1 % NaCl			5 % NaCl			10 % NaCl			
	12°	15°	37°	12°	15°	25°	12°	15°	25°	37°
3,00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,88	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,73	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,29	limes	limes	limes	limes	+	+	limes	+	+	+
0,18	—	—	—	—	limes	limes	—	+	+	limes
D 24^h	2174	2174	2174	2174	3511	3511	2174	> 5556	> 5556	3511

Tabelle XVI.

Aplysia limacina. Leberplasma dialysiert 0,5 %. Hierauf Zusatz von NaCl zu 4 %.

Versuch bei 15 und 37° zu verschiedenen Zeiten abgebrochen.

Ferment-menge	Temperatur 15°				Temperatur 37°			
	Abgebrochen nach				Abgebrochen nach			
	3h	6h	9h	24h	3h	6h	9h	24h
3,00	+	+	+	+	+	+	+	+
1,88	limes	limes	+	+	+	+	+	+
1,17	—	"	+	+	+	+	+	+
0,73	—	"	+	+	+	+	+	+
0,46	—	"	+	+	limes	limes	limes	+
0,29	—	—	limes	+	—	—	—	limes
0,18	—	—	—	limes	—	—	—	—
	Das erste Röhrchen ist bereits zersetzt, 2—5 sind wohl noch blau, zeigen aber bereits deutlich, daß Stärke hydrolysiert wurde	Röhrchen 2–5 eben an der Grenze	Röhrchen 1—5 eben positiv vorwiegend Erythrodextrin	$D_{24h}^{15°} = 3511$	Die positiven Röhrchen bleiben auf Jodzusatz vollkommen farblos			
					$D_{3h}^{37°} = 1389$	$D_{6h}^{37°} = 1389$	$D_{9h}^{37°} = 1389$	$D_{24h}^{37°} = 2174$

Tabelle XVII.

Labrus festivus. Lebersuspension 5 % und 0,5 %iges Plasma nach 24h.

Versuchsdauer: 24h bei 15 und 37°.

Fermentmenge	Lebersuspension 5 % frisch		Leberplasma nach 24h abzentrifugiert
	15°	37°	37°
3,00	+	+	+
1,88	+	+	+
1,17	+	+	limes
0,73	+	+	—
0,46	+	+	—
0,29	+	+	—
0,18	limes	limes	—
$D_{24h}^{37\text{ u. }15°}$	351	351	532

Tabelle XVIII.

Pflanzendiastase in 0,1 %iger Lösung.

Fermentmenge	Nativ	Dialysiert	Dialysiert + 1 % NaCl
3,00	+	—	+
1,88	+	—	+
1,17	+	—	+
0,73	+	—	+
0,46	+	—	limes
0,29	+	—	—
0,18	+	—	—

Untersuchungen über den Inulinstoffwechsel bei Cichorium Intybus L. (Zichorie).

II. Entstehung und Speicherung des Inulins.

Von

V. Grafe und V. Vouk.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der k. k. Universität in Wien. Nr. 48 der zweiten Folge.)

(Eingegangen am 11. November 1912.)

Mit 1 Tafel.

In unserer ersten, diesem Gegenstande gewidmeten Mitteilung[1]) haben wir der Vermutung Ausdruck gegeben, daß Inulin schon bei der Kohlensäureassimilation der Zichorie gebildet werde und nicht erst durch Kondensation von in die Wurzel abgeleiteten Monosaccharids.

Die in der vorliegenden Abhandlung beschriebenen Versuche waren in erster Linie der definitiven Erledigung dieser Frage und den weiteren Schicksalen des Inulins gewidmet. Bei der Beschaffung des Materials wurden wir in dankenswerter Weise wieder durch die Firma Heinr. Franck Söhne, Linz a. D., unterstützt, indem die Genannten uns für diese Versuche die Freilandpflanzen ihrer Kulturen in Agram und Mosonszentjános (Ungarn) zur Verfügung stellten, womit naturgemäß in dieser Frage einwandfreiere Resultate erzielt werden konnten als mit Gewächshauspflanzen[2]).

Das als Trockensubstanz verarbeitete Material wurde von dem einen von uns auf den Agramer Versuchsfeldern der

[1]) Diese Zeitschr. **48**, 424, 1912.

[2]) Ein in der biologischen Versuchsanstalt in Wien angelegtes Beet mit Zichorienpflanzen diente uns zur bequemen Nachprüfung der Versuchsergebnisse.

Firma Heinr. Franck Söhne zu bestimmten Tageszeiten gesammelt und sofort weiterverarbeitet. Die aus der Erde gehobenen Pflanzen wurden mit der Schere in Wurzel und Blätter getrennt und bei den letzteren noch eine Teilung in Blattspreiten einerseits, in die Mittelrippe und den kurzen Blattstiel andererseits vorgenommen. Wurzel und Blatteile wurden möglichst klein zerschnitten und jedes für sich zunächst am Sandbade unter beständigem Bewegen mit dem Glasstabe bei 80 bis 100° und dann andauernd am Wasserbade so lange getrocknet, bis die Substanz sich mittels einer Mühle fein pulverisieren ließ. Es wurde jederzeit darauf Rücksicht genommen, die Pflanzen nur nach schönen, sonnigwarmen Tagen zu ernten, wenn eine ausgiebige Assimilationstätigkeit angenommen werden konnte. Gleichzeitig mit der Herstellung des Trockenmaterials wurde ein Teil der Ernte für die spätere mikroskopische Untersuchung in starken Alkohol eingelegt. In dem Wurzelmaterial wurde bei dem wochenlangen Stehen das Inulin als weißer Bodensatz gefällt, der um so stärker ausfiel, je später innerhalb der Jahreszeit die Wurzel geerntet war, wodurch sich schon rein äußerlich die fortschreitende Anreicherung des Inulins in der Wurzel zeigte. Von jeder Versuchsserie wurden stets mehrere Parallelversuche durchgeführt, die untereinander völlig befriedigend übereinstimmten; die mitgeteilten Ziffern sind Mittelwerte.

3. Versuch.

Zichorienanbau (Magdeburger Samen) vom 11. Juni 1912 des Agramer Versuchsfeldes. Geerntet am 13. August um 4 Uhr nachmittags. Das trockene, fein zerriebene Material wurde 1 Stunde am kochenden Wasserbad nach Zugabe von etwas $CaCO_3$ zur Neutralisation etwaiger Pflanzensäuren extrahiert; der lichtbraune Extrakt abgesogen, mit Bleiacetat gefällt, durch verdünnte Schwefelsäure entbleit und in einer bestimmten Menge der mit fester Soda neutralisierten Flüssigkeit der Zucker nach I. Bang ebenso, wie in der vorhergehenden Mitteilung beschrieben ist, bestimmt. Ein anderer Teil wurde mit Salzsäure (20 ccm konz. HCl auf 100 ccm Flüssigkeit) durch $^1/_4$ stündiges Kochen hydrolysiert und im Hydrolysat der aus Inulin entstandene reduzierende Zucker gefunden, woraus sich

durch Abziehen des vor der Hydrolyse vorhanden gewesenen Zuckers und Multiplikation mit dem zugehörigen Faktor die Menge des Inulins ergab. Die Analyse ergab:

	Reduzierender Zucker %	Inulin %
1. Blattspreiten . . .	2,9	2,9
2. Mittelrippe	9,4	4,24
3. Wurzel	3,41	48,9

Die Identität des reduzierenden Zuckers mit Lävulose wurde wieder nach Sieben bestimmt; nach 3stündigem Kochen mit Salzsäure konnte das Vorhandensein von reduzierendem Zucker nicht mehr festgestellt werden; da nun durch diese Operation wohl die ganze Lävulose, in kaum nennenswerter Weise dagegen die Dextrose zerstört werden soll (s. dagegen die Einwände von Herzfeld, Wichmann, Dammüller[1]), erscheint der Schluß gerechtfertigt, daß der von uns gefundene reduzierende Zucker nur Lävulose, demnach als Polysaccharid nur Inulin vorhanden war. Ein absolut verläßliches quantitatives Verfahren, um Dextrose neben Lävulose nachzuweisen, existiert leider nicht, aber selbst bei Berücksichtigung der möglichen Fehlerquellen der Siebenschen Methode kann man sicherlich nicht von erheblichen Mengen Stärke im Assimilationsgewebe der Blätter sprechen, wenn man überhaupt solche annehmen will. Die mikroskopische Stärkeprobe der mit Jod-Chloralhydrat behandelten, in Alkohol konservierten Blätter, zeigt nämlich stärkeähnliche Einschlüsse der Chloroplasten, die sich mit Jod braun (mit einem Stich ins Blaue) färben, aber nicht die typische Blaufärbung der gewöhnlichen Stärkereaktion zeigen. Auch makroskopisch konnte im Extrakte mit Jod keine Stärkefärbung erhalten werden. Dazu kommt noch, daß in Schnitten der Wurzel auch unter dem Mikroskope keine stärkeähnlichen Gebilde beobachtet werden können, sondern ausschließlich dicht gelagerte Inulinsphärite und -schollen, während man doch annehmen müßte, daß auch in der Wurzel eine Wiederkondensation des wandernden Zuckers zu Stärke neben jener zu Inulin eintritt, wenn man sich nicht eine Umwandlung

[1]) E. v. Lippmann, Die Chemie der Zuckerarten I., S. 895.

der Stärkedextrose in Lävulose während der Wanderung vorstellen will.

Wie dem auch sein möge, durch den vorgenannten Befund ist das Auftreten von relativ so erheblichen Mengen Inulin in den Blattspreiten sichergestellt, daß nunmehr dessen Entstehung als Kondensationsprodukt bei der Kohlensäureassimilation als Tatsache genommen werden kann. Natürlich kann man hier nicht so enge Beziehungen zum Chloroplasten erwarten, wie sie die Stärke auszeichnen, denn Inulin ist im Zellsaft löslich und andrerseits doch nicht in so großer Menge vorhanden, daß man seine Ausfällung in Sphäriten durch Alkohol ersichtlich machen könnte. Dies gelingt erst, wie später am Beispiel der Mittelrippe gezeigt werden wird, bei einem Mindestgehalt von über 4 % Inulin. Bemerkenswert ist die Gleichheit der Beträge von red. Zucker und Inulin, die wohl darauf zurückzuführen ist, daß sich einerseits bei fortdauernder Zuckerbildung durch Assimilationstätigkeit das Gleichgewicht Lävulose—Inulin sehr schnell einstellt, andrerseits durch beständige Verwandlung des Polysaccharids in Lävulose zum Zwecke der Ableitung für die Konstanz dieses Gleichgewichtes gesorgt wird.

Um die so gewonnenen Ergebnisse durch Versuche mit frischem Pflanzenmaterial zu ergänzen, wurden frische, ausgewachsene Blätter um $3^1/_2{}^h$ p. m. an einem schönen sonnigen Herbsttag gesammelt (Versuchsfeld in Mosonszentjános), samt den Blattstielen zerschnitten und 500 g derselben an Ort und Stelle durch Kochen mit 1850 ccm Wasser extrahiert und der Extrakt auf reduzierenden Zucker und Inulin geprüft.

Auf Lebendgewicht bezogen ergab die Analyse 1,16 % Lävulose und 1,25 % Inulin, so daß auch hier die beiden Werte gleich hoch befunden wurden. Das Vorhandensein von Inulin in Blättern wird übrigens schon von G. Kraus[1]) für Selliera radicans, von H. Fischer[2]) für Ligularia Kämpferi, Hertia crassifolia, Petasites nivens und officinalis angegeben. Mit unserem Befund von Inulin in den Blättern der

[1]) G. Kraus, Das Inulin-Vorkommen außerhalb der Kompositen. Botan. Zeitg. 35, 329, 1877.

[2]) H. Fischer, Über Inulin, sein Verhalten außerhalb und innerhalb der Pflanze. Cohns Beiträge z. Biol. d. Pflanzen 8, 92, 1902.

Zichorie als Resultat der Kohlensäureassimilation ist gezeigt, daß Inulin nicht nur in den Reservestoffbehältern für die Zwecke der Speicherung erzeugt, sondern direkt bei der Stoffneubildung in den Assimilationsorganen der Pflanze gebildet wird. Einen ganz analogen Fall beschreibt A. Mayer[1]) in der Darstellung seiner äußerst eingehenden Versuche, die sich auf die Assimilationsprodukte der Laubblätter angiospermer Pflanzen bezogen. Der genannte Autor fand in den Blättern von Yucca filamentosa als Resultat der Assimilationstätigkeit neben Lävulose einen nicht reduzierenden Zucker, der bei der Hydrolyse Lävulose gab und dessen Identität mit Sinistrin festgestellt wurde. „In der Tat enthalten die Blätter von Yucca so reichlich Sinistrin, daß wir annehmen müssen, es werde transitorisch in den Yuccablättern als Reservestoff gespeichert. Die Tatsachen zeigen uns, daß je nach den Verhältnissen beim Assimilationsprozesse das eine Mal direkt Stärke, das andere Mal direkt Zucker entsteht, keinesfalls aber darf Stärke als ein stets auftretendes Glied im Assimilationsprozesse angesehen werden, da wir in allen Fällen bei künstlicher Spaltung der Stärke durch Fermente oder Säuren Dextrose entstehen sehen und das Auffinden von Lävulose in den Blättern von Allium porrum beweist, daß hier keine Stärke vor der Lävulose und als Muttersubstanz derselben vorhanden gewesen sein kann.“ Nun ist Sinistrin eines jener Polysaccharide, die, noch wenig untersucht, dem Inulin sehr nahe stehen und zu diesem vielleicht dieselbe Stellung einnehmen wie die Dextrine zur Stärke. Sie alle liefern bei der Hydrolyse mehr oder weniger leicht Lävulose, daneben aber auch, wie übrigens nach neueren Forschungen auch das Inulin, in geringer Menge Dextrose. Wie weit diese Dextrosegruppen im Molekül des Inulins und seiner hochmolekularen Abbauprodukte vorgebildet sind oder ob sie sich erst sekundär gemäß der von Lobry de Bruyn und van Ekenstein studierten leichten Umwandelbarkeit der beiden genannten Monosen ineinander aus der primär entstandenen Lävulose bilden, kann wohl kaum entschieden werden. Möglicherweise haben wir es hier mit physiologischen

[1]) A. Mayer, Über die Assimilationsprodukte der Laubblätter angiospermer Pflanzen. Botan. Zeitg. 43, 488, 1885.

und chemischen Übergangsgliedern von Inulin zu Stärke zu tun. Das würde auch das Auftreten der stärkeähnlichen Gebilde erklären, die schon Prantl[1]) beschreibt und die mit Jod wohl eine Färbung geben, die aber doch von der typischen Stärkereaktion abweicht. Man beobachtet diese Färbung mit Jod, wie später noch darzulegen, an mikroskopischen Schnitten, während es uns nie gelang, in Blattextrakten makrochemisch mit Jod eine andere als eine Braunfärbung zu erlangen. Tatsächlich sprechen manche Autoren wie H. Fischer diese Körper als gewöhnliche Stärke an, wenn er von ihnen sagt, daß „die Wanderung der Assimilationsprodukte nach den Stätten der Speicherung sich in der Weise vollzieht, daß wohl überall schon in den Blättern aus Dextrose — die sich bei ausgiebiger Assimilation in den Chlorophyllkörnern als Stärke niederschlagen kann — Lävulose gebildet wird, die entweder schon im Blattparenchym oder in den Blattnerven, im Blattstiel oder in höheren oder tieferen Regionen des Stammes . . . sich zu Inulin kondensiert“[2]). Ein unerwartetes Resultat ergab die Prüfung jener Blätter, die um 5 Uhr früh gesammelt worden waren, in denen man also nach Analogie der Blätter bei Stärkepflanzen eine nächtliche Auswanderung des Inulins hätte annehmen können.

1. Versuch.

Aussaat vom 12. Mai, Agramer Versuchsfeld, Ernte am 7. August 1912 um 5 Uhr früh. Die Analyse ergab:

	Lävulose %	Inulin %
1. Blattspreite . . .	2,8	3,0
2. Mittelrippe . . .	9,8	3,7
3. Wurzel	0,91	52,3

4. Versuch.

Aussaat vom 11. Juni 1912, Agramer Versuchsfeld, Ernte am 14. August 1912 um 5 Uhr früh. Die Analyse ergab:

	Lävulose %	Inulin %
1. Blattspreite . . .	2,48	2,8
2. Mittelrippe . . .	9,68	3,47

[1]) K. Prantl, Das Inulin, München 1870.

[2]) H. Fischer, l. c., S. 98.

Es ergibt sich also auch bei den am Morgen gesammelten Blättern nicht nur eine erhebliche Menge Inulin, sondern auch wie bei den Tagesblättern das Gleichgewichtsverhältnis zwischen Lävulose und Inulin. Hier tritt der physiologische Unterschied zwischen Stärke und Inulin deutlich hervor. Während die unlösliche Stärke sich anhäufen kann und so aus dem Druckgetriebe der Zelle ausscheidet, zum Auswandern erst der Hydrolyse bedarf, vermag das Inulin offenbar als lösliches und — wenn auch in nicht sehr bedeutendem Maße (Inulin wandert nach A. Meyer, l. c., ca. 20mal langsamer durch Pergamentpapier als Lävulose, wodurch freilich keine Analogie mit den Diffusionsverhältnissen der lebenden Zelle geschaffen ist) — diffusibles Kohlenhydrat sofort nach seiner Entstehung abzuströmen, wodurch nach dem Massenwirkungsgesetz die Bildung neuen Inulins unter Wahrung des Gleichgewichtes Lävulose-Inulin ermöglicht wird. Trotzdem müßte aber, da ja während der Nacht kein neuer Zucker gebildet wird, wenigstens eine Verminderung des Inulins in den Morgenblättern gegenüber den Tagesblättern festzustellen sein. Da dies nicht der Fall ist, liegt der Gedanke nahe, es möchte die Ableitung der Assimilations-Kohlenhydrate während der Nacht überhaupt eingeschränkt oder sistiert sein. Auf die Bedeutung des Lichtes für die Permeabilität hat ja kürzlich A. Tröndle[1]) aufmerksam gemacht, und unsere vorläufigen Versuche mit Stärkepflanzen lassen tatsächlich diese Möglicheit zu; sie sollen im Frühling, wenn die Lichtverhältnisse eine ausgiebige Assimilationstätigkeit ermöglichen, mit Freilandpflanzen durchgeführt werden. Bisher hat man lediglich aus dem negativen Befunde mit der Jod-Stärkereaktion am Morgen auf eine nächtliche Auswanderung der Stärke aus den Blättern geschlossen, Zuckeranalysen sind aber bisher kaum jemals mit Berücksichtigung von Tageszeit, Temperatur, Licht usw. durchgeführt worden[2]), so daß es nicht ausgeschlossen erscheint, daß bei Nacht wohl eine Hydrolyse der Stärke stattfindet, so daß diese am Morgen nicht entdeckt werden kann, daß aber dafür noch die äquivalente Menge reduzierten Zuckers im Blatte vorliegt.

---

[1]) A. Tröndle, Der Einfluß des Lichtes auf die Permeabilität der Plasmahaut. Jahrb. f. wiss. Botan. 48, 175, 1910.

[2]) Siehe Czapek, Biochemie d. Pflanzen I., S. 390.

Die vorgenannten Diffusionsverhältnisse und die nicht unbeträchtlichen Inulinmengen in den Blattnerven lassen durchaus die Möglichkeit zu, daß das Inulin als solches wandert, immerhin aber deutet das Vorwiegen von Lävulose in den Mittelrippen darauf hin, daß als Wanderungsform des Inulins die Monose auftritt, wobei es lokal zu teilweiser Wiederkondensation kommt. Vergleichende Plasmolyseversuche, die wir mit Lävulose und Inulin an Elodea- und Cichoriumzellen anstellten, scheiterten an dem Umstand, daß Inulin in kaltem Wasser höchstens im Verhältnis 1:10000 löslich ist, in welcher Verdünnung es natürlich glatt endosmiert.

Bemerkenswert ist die fortschreitende Füllung des Reservestoffbehälters, der Wurzel, mit Inulin, parallel mit dem Fortschreiten der Vegetationsperiode, wobei sich ebenso gleichmäßig die Quantität des reduzierendes Zuckers vermindert, indem dieser ebenfalls bis auf einen Gleichgewichtsrest der Kondensation zu Inulin unterliegt. Bevor das Material zur Prüfung auf Kohlenhydrate extrahiert wurde, unterwarfen wir es einer Extraktion mit absolutem Äther; wenn auch die gewonnenen Gewichtszahlen natürlich nicht nur auf Fett bezogen werden können, so seien sie in der folgenden Tabelle mitgeteilt, die einige Mittelwerte aus unseren Versuchen enthält:

In $^0/_0$ der Trockensubstanz	Blattspreiten		Mittelrippe und Blattstiel		Wurzel				
	morg.	abds.	morg.	abds.	55	62	74	85	120 Tage alt
Lävulose .	2,64	2,9	9,8	9,4	4,3	3,4	2,7	0,9	4,94
Inulin . .	2,9	2,9	3,7	4,24	21,4	30,6	48,9	52,29	60,85
Ätherlösliches . .	2,2	3,95	2,0	2,93	2,2	1,2	1,1	0,91	0,31

Es sei noch erwähnt, daß die Zichorienwurzeln, höchstwahrscheinlich im Milchsaft, ein Chromogen enthalten, das sich beim Stehen der zerschnittenen Wurzel an der Luft prachtvoll lachsrot färbt, während bei der Chloroformautolyse diese Färbung nicht eintritt[1]). Aus der vorstehenden Tabelle geht hervor, daß

[1]) Diese Methode hat bekanntlich zur Hervorrufung des Farbstoffes aus dem Chromogen mit Erfolg H. Molisch (Über das Vorkommen von Indican im Chlorophyllkorn der Indicanpflanzen) beim Indicannachweis und Nachweis anderer Farbstoffe verwendet. Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 17, 228, 1899; 19, 149, 1901.

mit fortschreitender Wurzelentwicklung der Gehalt an reduzierendem Zucker nicht fortdauernd auf Kosten der Inulinzunahme absinkt, sondern im Gegenteil in der ausgereiften Wurzel, wenn deren Inulinbestand sein Maximum erreicht hat, wieder zunimmt, indem offenbar der rückläufige Prozeß des Inulinabbaues nach Überschreitung eines gewissen Gleichgewichts-Status einsetzt.

Wenn im Vorhergehenden der reduzierende Zucker stets als Lävulose bezeichnet wurde, soweit er bei der Hydrolyse des Inulins entstand, so ist das nicht absolut zutreffend, da bei diesem Prozeß nach neueren Untersuchungen[1]) neben Lävulose auch Dextrose im Verhältnis 12:1 entsteht. Namentlich mit Rücksicht auf den vorerwähnten Befund der dextrinartigen Gebilde in der Zelle war es von Interesse, das Verhältnis dieser beiden Monosen im Hydrolysat festzustellen.

25 g Trockensubstanz aus den gemahlenen Blattspreiten (Anbau vom 11. Juni 1912, Ernte vom 13. August 1912, 4 Uhr nachmittags, Agramer Versuchsfeld) wurden in der gewöhnlichen Weise entfettet, extrahiert, mit Bleiacetat gefällt, entbleit und mit Soda neutralisiert. Der Siebenschen Zerstörungsprobe durch 3stündiges Kochen mit 6fach normaler Salzsäure unterworfen, ergab sich ein verbleibender Zuckergehalt von 0,0562 g Zucker, der also, nachdem durch diese Kochdauer sämtliche Lävulose zerstört sein mußte, Dextrose war. Da in diesem Material nach dem früheren Befunde 2,9°/₀ Inulin vorhanden ist, das auf Lävulose umgerechnet den Betrag von 797,5 mg ergibt, so zeigt sich, wenn man für die Inulinhydrolyse das konstatierte Verhältnis 12:1 zugrunde legt, daß nach der Zerstörung der Lävulose 61,3 mg Dextrose vorhanden sein müßten, während tatsächlich nur 56,2 mg vorhanden sind. Daraus geht einerseits hervor, daß bei der Siebenschen Methode neben der Lävulose auch eine Spur Dextrose mitzerstört wird (der erwähnte Nachteil des Verfahrens), andererseits, daß der von vornherein außer dem Inulin in den Blattspreiten vorhandene reduzierende Zucker, der sich ja ebenfalls im Extrakte befinden mußte, durchaus Lävulose war.

---

[1]) C. Tanret, Bull. de la Soc. chimique (3) 9, 227, 1893; J. Wolff, Über die Zusammensetzung und die Untersuchung der Zichorienwurzel. Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußm. 3, 599, 1900.

Für die mikroskopische Analyse wurde das Alkoholmaterial verwendet und auch hier wieder zunächst die Blätter untersucht. Hier zeigten sich in den Chlorophyllkörnern als Einschlüsse feste Körperchen, die, der Jodprobe unterworfen, sich unbestimmt dunkelbraun färbten, jedenfalls nicht die gewöhnliche Blaufärbung der Stärke gaben und demnach nicht als typische Stärke anzusehen sind. Durch Einlegen in Alkohol konnte in den Blattspreiten kein Inulin in Sphäriten nachgewiesen werden, da hier offenbar die Inulinkonzentration für diese Probe noch nicht ausreicht. In den Gefäßbündelscheiden zeigten sich ebenfalls die charakteristischen, sich mit Jod braun färbenden Körperchen, wie wir deren Auftreten auch schon in den Keimlingen beobachtet und in der ersten Mitteilung beschrieben haben. In den Blattstielen zeigen sich diese dextrinartigen Körperchen wieder in der Gefäßbündelscheide (Tafel I, Fig. 1), daneben im Parenchym, wenn auch nur in einigen Zellen, mit Alkohol ausfallend, die charakteristischen Inulinsphärite. In der Wurzel tritt in allen Zellen so massenhaft Inulin auf, daß die Zellen damit voll gefüllt sind, die Krystalle einander in der Ausbildung hindern und mehr die Form von Schollen als von Sphärokrystallen annehmen (Tafel I, Fig. 2).

Als wesentlichstes Ergebnis unserer bisherigen Untersuchung kann man

1. die festgestellte Tatsache ansehen, daß Inulin nicht nur allein als Speicherungsprodukt, sondern schon als ein mit der Kohlensäureassimilationstätigkeit der Zichorienpflanze verknüpftes Kohlenhydrat erscheint (wobei aber sein Auftreten im Chloroplasten natürlich nicht beobachtet werden kann), da es sich makrochemisch in erheblicher Menge in den Blattparenchymzellen junger Blätter findet und nachweisen läßt;

2. konnte kein Unterschied im Inulin- und Zucker-(Lävulose)-gehalt von am Nachmittag und am Morgen gesammelten Blättern konstatiert werden, woraus geschlossen werden kann, daß die neu gebildeten Kohlenhydrate schon während des Tages bis zur Einstellung eines bestimmten Gleichgewichtes zwischen Inulin

und Lävulose auswandern. Mitbestimmend für dieses Verhalten ist wohl die Tatsache, daß Inulin infolge seiner Diffusionsfähigkeit durch die lebende Zelle als solches wandert; selbstverständlich tritt dabei infolge der immerhin gegenüber der Lävulose schwerer vor sich gehenden Leitung des Inulins dessen beständige Hydrolyse in Lävulose und Weiterbewegung als solche ein.

3. Es zeigt sich mit fortschreitender Entwicklung der Wurzel eine fortdauernde Anreicherung derselben an Inulin, wobei zunächst die Beträge des reduzierenden Zuckers abnehmen, um schließlich bei reifen Wurzeln sich wieder zu erhöhen, woraus hervorgeht, daß diese Vorgänge der reine Ausdruck von physiologischen Gleichgewichtsverhältnissen sind.

Die weiteren Untersuchungen sollen sich mit dem Austreiben der überwinterten Wurzeln und der chemischen Umwandlungen der Reservestoffe beim Austreiben sowie mit den stofflichen Veränderungen bei der Samenreifung beschäftigen.

Über die Pentose der Guanylsäure.

Von

Kj. O. af Klercker.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Lund, Schweden.)

(Eingegangen am 8. November 1912.)

Die nähere Charakterisierung der Organpentosen hat besonders wegen der Pentosenausscheidung Interesse gehabt. Es lag ja nahe, hier eine Quelle zu vermuten. Während die Harnpentose jetzt mit großer Sicherheit der Arabinosegruppe zugerechnet werden kann, haben die Ansichten über die nähere Art der Organpentosen sehr divergiert, und die Kontroversen hierüber sind noch nicht abgeschlossen. Gegenstand einer näheren Untersuchung in dieser Beziehung sind die Pentosen des Pankreasproteids resp. der Guanylsäure, des Leberproteids und der Inosinsäure der Muskeln gewesen. In Zusammenhang mit meinen eigenen Studien über die Pentosurie[1]) wurde ich auch dazu geführt, einige Untersuchungen über die Pentose der Guanylsäure des Pankreas anzustellen, worüber ich im folgenden berichten will. Zuerst sei jedoch als Orientierung ein kurzer Überblick über die früheren wichtigsten diesbezüglichen Untersuchungen vorausgeschickt, speziell um die faktischen Darlegungen, worauf die Autoren ihre jeweilige Auffassung von der Form der Pankreaspentose begründen, zu einer kritischen Übersicht zu bringen.

Die Pankreaspentose wurde bekanntlich schon 1894 von Hammarsten[2]) mit größter Wahrscheinlichkeit als ein Bestandteil eines aus Pankreas isolierten Nucleoproteids nachgewiesen. Er fand nämlich als

[1]) Nordiskt med. Arch. Afd. II, Nr. 1 u. 6, 1905. — Arch. f. klin. Med. 108, 277, 1912.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 19, 18, 1894.

Spaltungsprodukt dieses Proteids unter anderem auch einen Körper, der die Tollenssche Phloroglucinreaktion zeigte, Furfurol bei Destillation mit HCl lieferte und eine Phenylhydrazinverbindung gab, die bei 159° schmolz. Er wies auch auf die eventuelle Bedeutung dieses Befundes für die Erklärung der Pentosurie hin. Später konnte Salkowski[1]) die Pentosennatur des fraglichen Körpers durch Elementaranalyse des Osazons bestätigen. Das Osazon wurde auch von ihm polarimetrisch untersucht. In 0,4%iger alkoholischer Lösung schien es optisch inaktiv zu sein. Bei größerer Konzentration war die Ablesung unmöglich. Wegen der vollkommenen Übereinstimmung in physikalischer Hinsicht glaubte er auch, mit einer an Gewißheit grenzenden Wahrscheinlichkeit annehmen zu können, daß dies aus Pankreas erhaltene Osazon mit dem Harnpentosazon identisch war.

Einen Schritt weiter bedeutete es, als Bang[2]) die Pentose als einen Bestandteil der von ihm aus dem Pankreasnucleoproteid isolierten Nucleinsäure, der von ihm näher studierten Guanylsäure, nachwies. Unter den hydrolytischen Spaltungsprodukten der Guanylsäure konnte er nämlich Pentose zu ungefähr 30% nachweisen. Er machte auch eine polarimetrische Untersuchung der wässerigen Lösung nach der Hydrolyse und glaubte hierbei eine geringe Rechtsdrehung zu sehen, die jedoch schwach war, so daß der Drehungsgrad nicht genau bestimmt werden konnte. Er will auch jetzt kein Gewicht mehr auf diese Beobachtung legen. (Mündliche Mitteilung.)

Neuberg[3]) hat als erster versucht, die Pankreaspentose näher zu bestimmen. Als Ausgangsmaterial diente ihm das nach Salkowski dargestellte Rohproteid aus Pankreas. Nach der optischen Prüfung des Osazons, aus dem Hydrolysat zu urteilen, mußte er annehmen, daß l-Xylosazon vorläge und daß es sich also um irgendwelche von den drei dieses Osazon liefernden Isomeren handeln müßte. Nach Hydrolyse des Proteids mit Bromwasserstoffsäure stellte er aus der schließlich resultierenden Zuckerlösung durch Oxydation mit Brom eine Pentonsäure dar, die er als Brucinsalz isolierte und durch Vergleich mit dem Brucinsalz der synthetischen l-Xylonsäure mit dieser für identisch hält. Da es ihm außerdem gelang, die aus dem Brucinsalz regenerierte Säure in das charakteristische Cadmiumbromid-Cadmiumdoppelsalz überzuführen, glaubte er hiermit, den Zucker des Pankreasproteids in eindeutiger Weise als l-Xylose gekennzeichnet zu haben. Nachdem Wohlgemuth[4]) später die Pentose aus dem Nucleoproteid der Leber auf ganz dieselbe Weise ebenfalls als l-Xylose bestimmt hatte und später Neuberg und Brahn[5]) nach Hydrolyse der Inosinsäure auch hier eine Pentose erhalten und aus ihr ein Pentosazon mit einem auf l-Xylosazon gut stimmenden optischen

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 537, 1899.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 146, 1898/99.
[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 35, 1467, 1902.
[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 477, 1902/03.
[5]) Diese Zeitschr. 5, 438, 1907.

Verhalten dargestellt hatten, schien die Annahme, daß die Organpentose überall l-Xylose sei, sehr an Sicherheit gewonnen zu haben und hiermit die Frage nach einem etwaigen Zusammenhang zwischen Harn- und Organpentose in verneinendem Sinne entschieden zu sein.

Diese Auffassung blieb indessen nicht unbestritten. Der Widerspruch machte sich zuerst in bezug auf die Pentose der Inosinsäure geltend. Hier hatte Neuberg durch die optische Untersuchung des Osazons eigentlich auch nur ihre Zugehörigkeit zur Xylosegruppe bestimmt.

Nach Hydrolyse des im Fleischextrakt vorhandenen Inosins konnten so Haiser und Wenzel[1]) bald darauf zeigen, daß hier die Pentose selbst linksdrehend war, und insofern dieselbe Pentose in der Inosinsäure vorläge, war hiermit gezeigt worden, daß diese nicht l-Xylose sein konnte. Auf ihre Vermutungen, daß es sich um d-Lyxose handeln sollte, braucht nicht weiter eingegangen zu werden, da sie selbst diese Auffassung jetzt aufgegeben haben, nachdem sie bei Kontrolluntersuchungen die Inosinpentose mit synthetischer d-Lyxose nicht identisch fanden[2]). Bedeutend schwieriger ist es, der von Levene und Jakobs in mehreren Publikationen verfochtenen Ansicht von der d-Ribosenatur der Organpentose gerecht zu werden. Auch sie wurden durch ihre Untersuchungen von der Inosinsäurepentose zu dieser Auffassung geführt, und in bezug auf die Pankreaspentose begründen sie ihre Ansicht auf vermeintliche Übereinstimmung des Zuckers selbst und ihres p-Bromphenylhydrazons mit der Inosinsäurepentose bzw. dem entsprechenden Derivate. Der besseren Übersicht wegen will ich darum auch zunächst ihre Resultate in bezug auf die Inosinsäurepentose gesondert für sich kurz wiedergeben. Diese sind indessen teilweise sehr widersprechend und unklar. Während sie nämlich zuerst[3]) nach Hydrolyse der Inosinsäure eine rechtsdrehende, reduzierende Lösung bekamen, woraus es ihnen überhaupt nicht gelang, ein Phenylosazon darzustellen, finden wir in einer späteren Mitteilung die Behauptung, daß die Inosinsäurepentose linksdrehend sei[4]). In der Zwischenzeit[5]) war es ihnen gelungen, durch Erhitzung von inosinsaurem Baryt in neutraler Wasserlösung bei 125 bis 130° im zugeschmolzenen Glasrohre einen Hypoxanthinpentosekomplex abzuspalten, den sie je nach der Dauer der Erhitzung mit dem im Fleischextrakt vorhandenen, bekannten Inosin bzw. Carnin identisch fanden. Wahrscheinlich haben sie, obgleich ich dies nirgends direkt erwähnt finde, die fragliche Pentose durch Hydrolyse irgendeines dieser Körper erhalten. Die spez. Drehung der Carninpentose wird in anderem Zusammenhang als —19,5° angegeben[6]).

---

[1]) Monatsh. f. Chem. **30**, 147 u. 377, zit. nach Malys Jahresber. **39**, 447, 1909.

[2]) Monatsh. f. Chem. **31**, 357, zit. nach Malys Jahresber. **1910**, 70.

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **41**, 2703, 1908.

[4]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **42**, 3247, 1909.

[5]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **42**, 335, 1909.

[6]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **42**, 2473, 1909.

Hiermit würde die Möglichkeit von l-Xylose wie überhaupt jeder Zusammenhang mit der l-Reihe ausgeschlossen sein. Dagegen konnten die Verfasser den Zucker anfangs mit keiner der bekannten Pentosen aus der d-Reihe identifizieren. Sie nannten ihn darum Carnose[1]). Später haben sie ihn doch, wie erwähnt, als d-Ribose bezeichnet. Ihre Gründe hierfür lassen sich kurz folgendermaßen zusammenfassen. Durch Oxydation mit Salpetersäure konnten sie das Lacton einer inaktiven Trioxyglutarsäure bekommen, wie es ja aus der Konfiguration der Ribose und der hierbei entstehenden Symmetrie im Molekül zu erwarten war[2]); sowohl das p-Bromphenylhydrazon[3]) als das p-Bromphenylosazon[4]) verhielten sich als optische Antipoden zu den entsprechenden Verbindungen der l-Ribose resp. zeigten denselben Schmelzpunkt wie diese; endlich soll die Größe der optischen Drehung des Zuckers selbst diesen als Antipoden der l-Ribose charakterisieren[2]). Hierzu kann nun eingewandt werden, daß es sehr fraglich ist, ob l-Ribose überhaupt schon völlig wasserfrei dargestellt worden ist und ihre spez. Drehung als definitiv festgestellt angesehen werden kann. Während van Ekenstein und Blanksma ursprünglich $[\alpha]_D = +14^0$ fanden, haben sie in späteren Untersuchungen $+18{,}8^0$ gefunden und sollen angeblich die Hoffnung hegen, „durch weitere Reinigung der Substanz das Drehungsvermögen steigern zu können"[5]). Wie weit diese Steigerung gehen werde, läßt sich wohl schwer voraussagen. Der von ihnen angegebene, in Vergleich mit anderen Zuckern ungewöhnlich niedrige Schmelzpunkt ihrer l-Ribose von nur 87° scheint nicht gerade für einen völlig wasserfreien Zustand des Präparates zu sprechen.

Schließlich soll nur auf einen, von den Verfassern selbst erwähnten und noch nicht aufgeklärten Widerspruch in bezug auf das von ihnen hergestellte Phenylhydrazon ihrer Inosinsäurepentose erinnert werden. Sie fanden nämlich den Schmelzpunkt 27 bis 30° niedriger als den von Fischer und Piloty für das Ribosephenylhydrazon angegebenen[6]).

Wie gesagt, halten Levene und Jakobs die Pentose in den übrigen Nucleinsäuren für identisch mit der Inosinsäurepentose und betrachten infolgedessen die d-Ribose als die eigentliche Organpentose. Als faktische Unterlage für diese Behauptung in bezug auf die uns hier zunächst interessierende Guanylsäurepentose können, soviel ich ersehen kann, die Verfasser nur folgende Tatsachen anführen. Nach Hydrolyse von der Guanylsäure selbst haben sie ein p-Bromphenylhydrazon dargestellt, von dem sie kategorisch behaupten, daß es sich „im Schmelzpunkte und in der optischen Aktivität als mit dem Carnose-p-brom-

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 2102, 1909.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 3248, 1909.

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 2104, 1909.

[4]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 3249, 1909.

[5]) Zit. nach Levene und Jakobs, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 3248, 1909.

[6]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 2104, 1909.

phenylhydrazon identisch" zeigte[1]); weiter wollen sie den Zucker selbst rein dargestellt haben. Ihr Ausgangsmaterial war das sog. Guanosin, eine krystallinische Guaninpentoseverbindung, die sie nach Erhitzung von guanylsaurem Natron in neutraler Lösung auf 130 bis 135° im zugeschmolzenen Glasrohre erhielten. Nach Hydrolyse mit H_2SO_4 von diesem Guanosin resultierte schließlich ein Zuckersirup, der nach Impfung mit Carnose (d. h. der Pentose der Inosinsäure) fest wurde, einen Schmelzpunkt von 85° und eine Drehung von — 19,2° zeigte[2]).

Wenn nun auch diese Darlegungen sehr für die Identität der Guanylsäure- und Inosinsäurepentose sprechen, sind selbstverständlich dieselben Bedenken gegenüber der Identifizierung der Guanylsäurepentose mit der d-Ribose geltend zu machen, wie in bezug auf die Inosinsäurepentose. Außerdem ist zu bemerken, daß es späteren Nachuntersuchern nicht gelungen ist, des Ausgangsmaterials ihrer Guanylsäurepentose, des Guanosins, überhaupt habhaft zu werden[3]). E. Schulze[4]) hat nun aus gewissen Pflanzen einen Guaninpentosekomplex, das sog. Vernin, isoliert, das dem Guanosin ähnlich erscheint; es zeigt in alkalischer Lösung dieselbe optische Drehung, liefert bei Hydrolyse mit H_2SO_4 einen Zucker, der, im Vakuumexsiccator getrocknet, eine spez. Drehung von — 17,7° zeigte. Wenn die Existenz des Guanosins vielleicht nicht völlig von der Hand zu weisen ist, scheinen in Anbetracht der erörterten Widersprüche dennoch weitere Kontrolluntersuchungen hier unbedingt erforderlich zu sein.

Gegenüber Levene und Jakobs hat nun Neuberg[5]) darauf hingewiesen, daß er nur den Zucker, der nach Hydrolyse des nach Angabe von E. Salkowski dargestellten Pankreasproteids erhalten wird, untersucht habe, und er meint, daß dieses Produkt l-Xylose ist. „Es kann sich nur darum handeln, ob daneben auch Ribose auftritt." Die Tatsache, daß während Rewald[6]) nach Hydrolyse des Pankreasproteids ein p-Bromphenylosazon mit den physikalischen Eigenschaften der entsprechenden l-Xyloseverbindung darstellen konnte, Steudel und Brigl[7]) dagegen für dieselbe Verbindung mit der Pentose aus der Guanylsäure einen mit dem d-Arabinose-p-bromphenylosazon stimmenden Schmelzpunkt fanden, konnte zunächst dafür sprechen, daß die Lösung in dieser Richtung hin zu suchen wäre. Andererseits spricht hiergegen die Angabe Levenes und Jakobs[8]), daß sie nach Hydrolyse des Pankreasproteids selbst ein Phenylosazon haben isolieren können, das in optischer Hinsicht in Pyridinalkohol nach Neuberg mit dem

---

1) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 2472, 1909.
2) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 2473, 1909.
3) Steudel und Brigl, Zeitschr. f. physiol. Chem. 68, 46 bis 48, 1910.
4) Zeitschr. f. physiol. Chem. 66, 128.
5) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 2806, 1909.
6) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 3134, 1909.
7) Zeitschr. f. physiol. Chem. 68, 48 bis 50, 1910.
8) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 43, 3147, 1910.

d-Arabinosazon (bzw. d-Ribosazon) ziemlich gut stimmte (0,20 g, 10 ccm Pyridinalkoholgemisch, 1 dm-Rohr, Na-Licht, $\alpha = -0{,}94^0$).

Aus dieser Übersicht geht also hervor, daß über die nähere Art der Organpentose eine völlige Einigung der Autoren bisher nicht vorhanden ist, insbesondere nicht in bezug auf die optische Drehungsrichtung. Handelt es sich um l-Xylose, muß sie selbstverständlich rechtsdrehend sein, ist sie dagegen d-Ribose, muß sie linksdrehend sein, wie es ja auch Levene und Jakobs in Übereinstimmung hiermit fanden. Neuberg hat indessen, soviel ich ersehen kann, überhaupt keine optische Untersuchung der Pentose selbst gemacht.

Sowohl l-Xylose als d-Ribose geben nun beide linksdrehende Phenylosazone, und solche haben sowohl Neuberg als Levene und Jakobs aus der Pankreaspentose dargestellt. Die Divergenzen zwischen ihren Beobachtungen betreffen hier nur die Größe dieser Linksdrehung. Während diese nämlich, wie gesagt, nach Neuberg mit derjenigen des l-Xylosazons gut stimmte, fanden Levene und Jakobs eine größere, dem d-Arabinosazon (bzw. Ribosazon) näherkommende Drehung. Gerade diese Divergenzen ihrer Beobachtungen finde ich sehr bemerkenswert. Nach der Angabe Neubergs über die optische Drehung des reinen l-Xylosazons ($-0^0\,15' = 0{,}25^0$) und des l-Arabinosazons ($+1^0\,10' = 1{,}17^0$) wäre es ja zu erwarten, daß die beidenfalls lävogyren l-Xylos- und d-Arabinosazone eine so bedeutende Differenz in bezug auf ihren optischen Drehungswinkel zeigen würden, daß sie hierdurch ziemlich sicher voneinander getrennt werden könnten. Die abweichenden Resultate der Autoren können hier auch kaum auf ein vermeintes Vorhandensein von verschiedenen Pentosen in Pankreas bezogen werden, denn hier sind die bezüglichen Osazone beidenfalls auf dieselbe Weise nach Hydrolyse des Rohproteids erhalten worden. Es war also hier ein Unterschied vorhanden, der sehr dringend zu einer neuen Untersuchung einlud, und es lag nahe, sich in erster Hand einer optischen Untersuchung des Phenylosazons der Pentose aus der Guanylsäure zuzuwenden, das merkwürdigerweise noch nicht in dieser Beziehung untersucht worden ist.

Da, wie bekannt, je drei isomere Pentosen, zwei Aldosen und eine Ketose ein und dasselbe Phenylosazon liefern, so daß das l-Xylosazon mit den Phenylosazonen der d-Lyxose und der ent-

sprechenden Ketopentose und das d-Arabinosazon mit denjenigen der d-Ribose und der d-Araboketose identisch ist, so war es im voraus zu erwarten, daß durch das optische Verhalten des Osazons nur die Zugehörigkeit zu irgendwelcher von diesen engeren Gruppen von Raumisomeren bestimmt werden konnte. Für die Frage eines möglichen Zusammenhanges der Organpentosen mit der Pentosurie dürfte jedoch schon die sichere Feststellung dieses Verhaltens nicht ohne gewisse Bedeutung sein. Eine eventuelle Zugehörigkeit der Xylosegruppe würde ja gewiß eher gegen einen solchen Zusammenhang sprechen, während dieser, wenn sie der Arabinosegruppe gehörte, vielleicht nicht bestimmt von der Hand zu weisen wäre. Wie ich indessen schon gleich vorausschicken will, stellte es sich heraus, daß jene Voraussetzung nicht völlig zutreffend ist. Aus meinen Untersuchungen ging nämlich hervor, daß das optische Verhalten der Osazone nicht brauchbar war, um die Arabinose- und Xylosegruppe sicher voneinander zu unterscheiden.

Eigene Untersuchungen.

Versuch 1.

Aus 15 Stück Ochsenpankreas wurde nach der Vorschrift von Bang[1]) die Kupferverbindung der Guanylsäure dargestellt, in Wasser aufgeschlammt, mit H_2S zersetzt und das klare Filtrat durch Kochen von H_2S befreit. Die etwas gelb gefärbte Lösung, die jetzt 200 ccm betrug, wurde sodann mit 2% HCl während 2 Stunden am Rückflußkühler auf kochendem Wasserbade erhitzt. Nach Abkühlung wurde mit NaOH neutralisiert, der entstehende Niederschlag (von Guanin) wurde abfiltriert. Das Filtrat stellte eine ziemlich gesättigt gelbe, 250 ccm betragende Flüssigkeit dar, die Fehlingsche Lösung deutlich reduzierte und eine ziemlich starke Orcinreaktion gab.

Eine Titration nach Bang gab 0,50% als Glucose berechnet. Bei polarimetrischer Untersuchung im 1 dm-Rohr konnte ich keine Drehung beobachten. Die starke Eigenfarbe der Flüssigkeit beeinträchtigte jedoch in hohem Grade die Genauigkeit der Ablesung. Eine Probe wurde darum mit Blutkohle und Alkohol entfärbt (50 ccm Flüssigkeit + 5 ccm 97%igen Alkohol + ungefähr 1 g Blutkohle), das Filtrat war beinahe völlig farblos. Im 3 dm-Rohr bei Auerlicht bekam ich als Mittel von fünf Ablesungen $-0{,}19^\circ \pm 0{,}02^\circ$.

Eine nachherige Titration der farblosen, alkoholischen Flüssigkeit zeigte, daß der Zuckergehalt nach der Behandlung beinahe völlig unverändert war. Berechnet auf die ursprüngliche Lösung erhielt ich

[1]) Diese Zeitschr. 26, 295 bis 298, 1910.

nach der Entfärbung 0,46 gegen 0,50 % vorher, als Glucose berechnet. Ein Versuch, aus der Flüssigkeit Phenylosazon herzustellen, gab eine so geringe Ausbeute, daß ich auf ihre weitere Bearbeitung verzichtete.

Versuch 2.

Eine Lösung von Guanylsäure wurde auf dieselbe Weise wie im vorigen Versuche hergestellt. Das Kupfersalz der Guanylsäure war von Prof. Bang, und zwar aus 30 Stück Pankreas hergestellt, und wurde mir von ihm zur weiteren Bearbeitung überlassen. Das Filtrat nach der H_2S-Behandlung, von H_2S befreit, machte jetzt 340 ccm aus, war schwach gelb gefärbt. Es zeigte eine ziemlich starke Rechtsdrehung, + 3,6° im 1 dm-Rohr. Es wurde jetzt mit Schwefelsäure zu 5 % versetzt und während 2 Stunden auf einem kochenden Wasserbade am Rückflußkühler erhitzt. Nach Erkalten wurde mit $Ba(OH)_2$ und $BaCO_3$ neutralisiert und das Filtrat wieder mit Essigsäure schwach angesäuert. Die Flüssigkeitsmenge belief sich jetzt auf ungefähr 425 ccm, gab starke Orcinreaktion, reduzierte bei Titration nach Bang wie eine 0,76 %ige Glucoselösung (Mittel aus zwei Bestimmungen). Die Lösung war stark gefärbt, im 3 dm-Rohr war keine Drehung bemerkbar. 50 ccm von der Flüssigkeit wurden ganz wie im früheren Versuche mit Alkohol und Blutkohle behandelt, wobei eine beinahe völlige Entfärbung eintrat. Eine deutliche Linksdrehung ließ sich nun ohne Schwierigkeit konstatieren, und zwar betrug die Ablenkung — 0,30°.

Die gesamte Flüssigkeit wurde darauf mit ungefähr 10 g salzsaurem Phenylhydrazin, 15 g essigsaurem Natrium in kochendem Wasserbade 1 Stunde erwärmt und durch einen Heißtrichter filtriert. Bei der Abkühlung fiel reichlich Osazon aus, das abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde abermals 1 Stunde im Wasserbade erwärmt, die Ausbeute wurde beinahe ebenso groß. Noch ein drittes Mal wurde diese Prozedur wiederholt. Die erhaltenen Osazonmassen, die sehr schön gelb aussahen, wurden vereinigt und mehrmals umkrystallisiert. Nach 3 Umkrystallisierungen wurde der Schmelzpunkt und die optische Drehung bestimmt und diese Bestimmungen nach weiteren Umkrystallisierungen noch zweimal wiederholt. Das Osazon wurde immer aus heißem, alkoholhaltigem Wasser umkrystallisiert und bei Zimmertemperatur im Exsiccator über $CaCl_2$ zur Gewichtskonstanz getrocknet. Bei der polarimetrischen Untersuchung wurde eine beliebige, genau abgewogene, 0,20 g nicht überschreitende Menge von Substanz in 10 ccm Pyridin-Alkoholgemisch Neubergs (4 ccm Pyridin + 6 ccm abs. Alkohol) gelöst und im 1 dm-Rohr beobachtet, unter Verwendung von einem Halbschattenapparat von Schmidt und Haensch, der eine Ablesung von 0,01° gestattete. Als Beleuchtung diente Auerlicht. Das Resultat zeigt nebenstehende Tabelle.

Durch diese Untersuchung konnte ich also die übereinstimmenden Angaben der früheren Beobachter von der optischen Linksdrehung des Phenylosazons der Organ- bzw. Pankreas-

Tabelle I.

Schmelzpunkt d. Osazons	In 10 ccm Pyridin-Alkohol gelöste Osazonmenge	Drehung der Lösung im 1 dm-Rohr	Bemerkungen	Für die Konzentration 0,20 g : 10ccm berechnete Drehung
154°	0,1968 g	–0,63° ± 0,05°	3mal umkrystallisiert	– 0,64°
158°–160°	0,1898 g	–0,56° ± 0,04°	4mal "	– 0,59°
159°–160°	0,1923 g	–0,58° ± 0,02°	5mal "	– 0,60°

pentose auch in bezug auf das entsprechende Derivat der Guanylsäurepentose bestätigen. Wie wir aus der Tabelle sehen, stimmt indessen die Größe der optischen Ablenkung des Osazons mit keinem von den beiden existierenden linksdrehenden Pentosazonen überein, weder mit derjenigen des l-Xylosazons noch mit der des d-Arabinosazons, so wie jene von Neuberg angegeben werden. Der Wert liegt ungefähr ebenso weit von beiden entfernt, und trotz mehrmaliges Umkrystallisierens blieb seine Größe unverändert. Indessen sind die Untersuchungen unter etwas verschiedenen Versuchsbedingungen gemacht worden. Erstens hat nämlich Neuberg Na-Licht gebraucht, während meine Bestimmungen unter Verwendung von Auer-Beleuchtung ausgeführt worden sind. Zweitens hat Neuberg seine Osazone aus Pyridin umkrystallisiert, ich aus alkoholhaltigem heißem Wasser. Nach meiner Erfahrung kann nämlich das Umkrystallisieren aus Pyridin bisweilen aus unbekannten Gründen mißlingen, so daß bei Verdünnung der Pyridinlösung mit Wasser das Osazon nicht wieder krystallinisch ausfällt, sondern eine kolloidale Lösung oder eine feine, durch das Filter gehende Suspension gebildet wird. Es war also notwendig, Kontrolluntersuchungen an Phenylosazonen aus l-Arabinose bzw. l-Xylose vorzunehmen, die auf dieselbe Weise wie hier umkrystallisiert worden waren. Arabinose stellte ich mir teils selbst her durch Hydrolyse von Rübenschnitzeln, teils wendete ich käufliche Arabinose von Merck an. Die Xylose war das Kahlbaumsche Präparat. Durch Schmelzpunktbestimmung und optische Untersuchung habe ich mich von der Identität der Präparate mit l-Arabinose bzw. l-Xylose vergewissert. Das Resultat der Untersuchung war das folgende:

Tabelle II.

Art der Pentose	Physikalische Untersuchung des Zuckers		Physikalische Untersuchung des entsprechenden Phenylosazons				
	Schmelzpunkt des Zuckers	Spez. Drehung des Zuckers	Schmelzpunkt des Osazons	In 10 ccm Pyridin-Alkohol gelöste Osazonmenge	Drehung der Lösung im 1 dm-Rohr	Bemerkungen	Für die Konzentration 0,20 g: 10 ccm berechnete Drehung
l-Arabinose (aus Rübenschnitzel)	157°–163°	+112,6° ± 1,3°	—[1])	0,2004 g	+0,69° ± 0,02°	3 mal umkrystallisiert	**+ 0,69°**
do.	157°–163°	+112,6° ± 1,3°	—[1])	0,1721 g	+0,54° ± 0,03°	4 mal umkrystallisiert	**+ 0,62°**
l-Arabinose (Merck)	160°	+108,3° ± 0,9°	160°–161°	0,0959 g	+0,32° ± 0,01°	2 mal umkrystallisiert	**+ 0,68°**
do.	160°	+108,3° ± 0,9°	162°	0,1915 g	+0,59° ± 0,02°	3 mal umkrystallisiert	**+ 0,62°**
l-Xylose (Kahlbaum)	145°–150°	+ 21,3° ± 0,8°	163°–164°	0,0989 g	–0,33° ± 0,01°	3 mal umkrystallisiert	**– 0,67°**
do.	145°–150°	+ 21,3° ± 0,8°	163°	0,0970 g	–0,34° ± 0,02°	4 mal umkrystallisiert	**– 0,70°**

Hieraus ist also wohl zu schließen, daß unter den hier gewählten Versuchsbedingungen das optische Verhalten des linksdrehenden Phenylosazons der Guanylsäurepentose zwar mit demjenigen des rechtsdrehenden l-Arabinosazons, von der entgegengesetzten Drehungsrichtung abgesehen, am meisten übereinstimmt, daß aber der Unterschied zwischen diesem und dem linksdrehenden l-Xylosazon in bezug auf den zahlenmäßigen Wert ihres Drehungsvermögens wider alles Erwarten nur unbedeutend ist. Die d-Arabinose und l-Xylose können infolgedessen nicht mit Sicherheit durch das optische Verhalten der bezüglichen Osazone voneinander unterschieden werden, da die Differenz innerhalb der Grenze der Beobachtungsfehler zu liegen kommt.

In bezug auf die eigentlich jetzt noch bestehende Meinungsdivergenz der Autoren, die ja, wie aus der historischen Einleitung hervorgeht, nunmehr hauptsächlich darauf hinausgeht, inwieweit l-Xylose oder eine Pentose der d-Arabinosegruppe, bzw. d-Ribose als Organpentose zu betrachten ist, haben meine

[1]) Durch Übersehen wurde es hier leider versäumt, den Wert zu notieren.

Untersuchungen dennoch ein positives Resultat gebracht. Aus der in beiden Versuchen festgestellten Linksdrehung des Hydrolysats der Guanylsäure ist nämlich mit größter Sicherheit zu schließen, daß auch die Pentose selbst linksdrehend ist, da die Guanylsäurelösung vor der Hydrolyse ja rechtsdrehend war, und andere linksdrehende Spaltungsprodukte im Hydrolysat nicht vorkommen. Die Linksdrehung kann auch nicht durch vorhandene Verunreinigungen der Guanylsäure unbekannter Art bedingt sein. Gegen eine solche Auffassung scheint mir vor allem der Umstand zu sprechen, daß die Reduktionskraft und die Größe der optischen Drehung des Hydrolysats in den beiden Versuchen ziemlich proportionelle Unterschiede zeigen. Im Versuch 2 finden wir nämlich beide ungefähr um 50% größer als im Versuch 1.

	Reduktion d. Hydrolysats als Glucose berechnet	Optische Drehung des Hydrolysats im 3 dm-Rohr
Vers. 1	0,50%	−0,19°
Vers. 2	0,76%	−0,30°

Diese Proportionalität zwischen den Größen der Reduktion und der optischen Drehung berechtigt wohl zu dem Schlusse, daß beide von wirklichen Komponenten der Guanylsäure herrühren.

Da nun die Xylosephenylosazone beidenfalls eine optische Drehung von entgegengesetzter Richtung gegenüber dem entsprechenden Zucker selbst zeigen, sprechen also meine Untersuchungen entschieden gegen das Vorliegen einer Xylose, lassen sich dagegen sehr gut mit der Annahme, daß die Pentose der Guanylsäure der d-Arabinosegruppe angehört, vereinen.

Ich möchte nur hinzufügen, daß auch das Aussehen des Osazons viel mehr demjenigen eines Arabinos- als Xylosazons ähnelt. Aus heißen Wasserlösungen krystallisieren nämlich die beiden Phenylosazone in so verschiedener Art und Weise, daß sie schon hierdurch zu erkennen sind. Das Xylosazon bildet hierbei hellgelbe seidenglänzende Nadeln, die schon makroskopisch als solche imponieren und Massen filzigen Gewebes bilden, während das Arabinosazon etwas mehr gesättigt gelb und matt ist und mehr wie gelatinierende Flocken ausfällt. Ohne ein

allzu großes Gewicht auf dieses Verhalten legen zu wollen, kann ich nicht umhin, darauf hinzuweisen, daß das Phenylosazon der Guanylsäurepentose immer auf diese letzte Art und Weise krystallisierte. Erwähnt sei außerdem, daß ich dasselbe Verhalten auch in bezug auf die Harnpentosazone meiner beiden Pentosuriefälle konstatieren konnte.

Um kurz zu resümieren, hat sich also als Resultat meiner Untersuchungen herausgestellt, daß das optische Verhalten der Phenylpentosazone nicht als Unterscheidungszeichen der Arabinose- bzw. Xylosegruppe untereinander geeignet ist, wenigstens nicht, wenn die Osazone durch Umkrystallisieren aus alkoholischem Wasser gereinigt sind; daß die Pentose der Guanylsäure indessen nicht l-Xylose sein kann, da sowohl sie selbst, als auch ihr Phenylosazon linksdrehend ist; daß aber alle Umstände sich mit der Annahme vereinigen lassen, daß die fragliche Pentose der d-Arabinosegruppe zugehört.

Über die Ausscheidung des Wassers bei der Atmung.

Bemerkung zu der gleichnamigen Arbeit von G. Galeotti (diese Zeitschr. Bd. 46, S. 173).

Von

A. Loewy und H. Gerhartz.

(Aus dem Tierphysiolog. Institut der Kgl. Landw. Hochschule, Berlin.)

(Eingegangen am 26. November 1912.)

Galeotti findet, daß unter mittleren normalen Bedingungen die mit der Atemluft ausgeschiedenen Wassermengen nahezu konstant sind, und daß so viel Wasser in der Ausatmungsluft enthalten ist, daß diese nicht, wie stets angenommen wird, mit Wasser vollkommen gesättigt ist, vielmehr nur zu ca. $^3/_4$, nämlich zu 78%.

Galeotti geht dabei von der allgemein für zutreffend gehaltenen Anschauung aus, daß die Exspirationsluft des Menschen eine Temperatur von 37° hat.

Diese Anschauung trifft jedoch nicht zu. Die Temperatur der Ausatmungsluft liegt wesentlich niedriger. Sie schwankt je nach den Versuchsbedingungen innerhalb gewisser Grenzen und liegt im allgemeinen zwischen 32,5° und 33,5°. Unter besonderen Bedingungen kann sie auf 34° steigen, unter anderen unter 32,5° hinabgehen.

Dabei ist bei Mundatmung die ausgeatmete Luft etwas wärmer als bei Nasenatmung.

Für die wirkliche Temperatur der Exspirationsluft würden nun die von Galeotti gefundenen Wassermengen nahezu volle Sättigung mit Wasserdampf bedeuten.

Die Folgerungen, die sich aus unseren Bestimmungen der Temperatur der Ausatmungsluft ergeben, sind die gleichen wie aus Galeottis Bestimmungen der abgegebenen Wassermenge.

Sie zeigen, daß die derzeitigen Anschauungen über die Mengen des von den Lungen abgegebenen Wassers nicht zutreffen können. Die Berechnung des Lungenwassers mußte zu hoch ausfallen, da man eben Sättigung bei 37° zugrunde legte. — Da bei experimenteller Bestimmung der Gesamtwasserabgabe die von der Haut abgegebene Wassermenge einfach als Differenz zwischen der gesamten und der von seiten der Lungen angenommenen Wasserabgabe angesetzt wurde, müssen bisher die Hautwasserwerte zu gering veranschlagt worden sein.

Über die Einzelheiten unserer Versuche und unserer Versuchsmethodik werden wir später berichten.

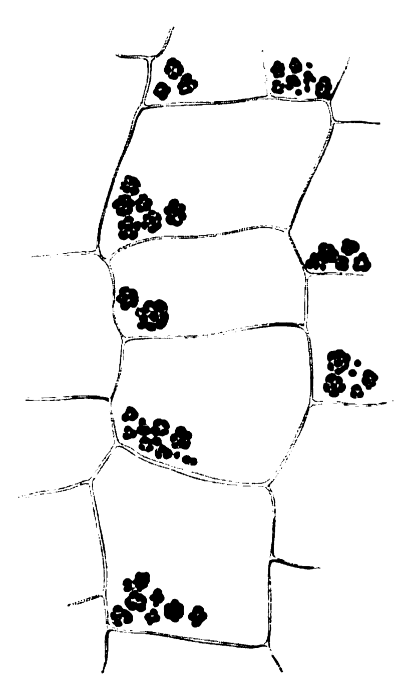


Fig. 1. Einige Zellen der Gefäßbündelscheide aus der Blattmittelrippe mit den charakteristisch geformten, stärkeähnlichen Körnchen. (Vergr. 250.)

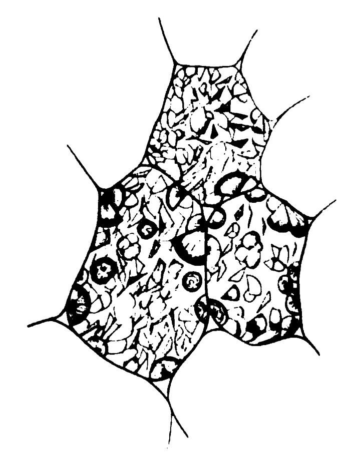


Fig. 2. Mit Inulinschollen und -sphäriten dicht gefüllte Zellen aus dem Wurzelgewebe. (Vergr. 250.)

Verlag von Julius Springer in Berlin.

Untersuchungen zur pharmakologischen Wirkung des p-Oxyphenyläthylamins.

Von

A. Bickel und Mich. Pawlow.

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Kgl. Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 23. Oktober 1912.)

Mit 9 Figuren im Text.

Die Mitteilung Burmanns[1]), nach der es ihm gelungen sei, aus dem Mutterkorn einen neuen Körper, nämlich das p-Oxyphenyläthylamin, zu isolieren, der den Träger wichtiger pharmakologischer Wirkungen des komplexen Mutterkornextraktes repräsentiere, knüpft an bekannte Tatsachen über die Komposition der wirksamen Bestandteile des Mutterkorns an. Es sei zunächst daran erinnert, daß ganz allgemein die verschiedenen Wirkungen des Secale cornutum, die gangränerzeugende Wirkung, die Gefäßwirkung und endlich die direkte Wirkung auf die glatte Muskulatur und speziell diejenige des Uterus zum Teil an verschiedenartige Bestandteile gebunden erscheinen. Unter den dem Paraoxyphenyläthylamin nahestehenden Produkten, die hierher gehörige Wirkungen entfalten, nenne ich nach dem Lehrbuch von Meyer und Gottlieb[2]) das Parahydroxyphenyläthylamin (Barger und Dale) und das β-Imidazolyläthylamin. Alle diese Stoffe verdienen deshalb unser besonderes Interesse, weil sie gleichzeitig als Eiweißabbauprodukte bekannt sind; so entsteht z. B. der vorletzt erwähnte Körper durch die Einwirkung von Mikroorganismen aus dem Tyrosin, der letztgenannte in gleicher Weise aus dem Histidin[3]).

[1]) Journal suisse de Chimie et Pharmacie 1912, Nr. 6.

[2]) Die experimentelle Pharmakologie, II. Aufl., S. 203 und 204.

[3]) Nach Nr. 2 zitiert.

Ferner sind diese aromatischen Aminobasen noch aus einem weiteren Grunde beachtenswert, speziell das Paraoxyphenyläthylamin; aus diesem kann sich nämlich im Organismus Adrenalin bilden und, wie wir sehen werden, bestehen zwischen dem Adrenalin und dem Paraoxyphenyläthylamin bemerkenswerte Ähnlichkeiten auch in biologischer Hinsicht.

Das Paraoxyphenyläthylamin, das unter dem Namen „Uteramin“ von der chemischen Fabrik „Zyma“ in St. Ludwig (Elsaß) nnd Aigle (Schweiz) in den Handel gebracht wird, war dem einen von uns (B.) früher zur pharmakologischen Begutachtung übersandt worden. Wenn dieses Präparat unterdessen schon in der geburtshilflichen Praxis mit Erfolg von Heimann[1]) vor allem zur Stillung von Blutungen aus dem schlaffen Uterus post partum angewandt worden ist — dieser Autor berichtet, daß die Blutungen prompt stehen und der Uterus sich kontrahiere —, so wird doch auch eine nachträgliche Mitteilung der rein pharmakologischen Untersuchungsresultate willkommen sein, da, wie wir oben bemerkten, das Paraoxyphenyläthylamin nicht nur von diesem praktischen, sondern auch vom rein theoretischen Standpunkte aus betrachtet uns Interesse abnötigt.

Zunächst wurde in einer Versuchsreihe an Hähnen ermittelt, daß diese Verbindung gangräneszierende Wirkungen nicht ausübt. Es gelangte eine $0{,}5\,^{0}/_{0}$ige Lösung in Wasser zur Anwendung, die subcutan injiziert ward. Davon erhielten 2 Hähne von 2,0 bzw. 2,5 kg Körpergewicht pro die während 10 Tagen 2 ccm und danach ebenso lange 5 ccm injiziert. Da an dem Kamme der Tiere sich auch nicht die geringsten Veränderungen zeigten, wurde der eine Hahn noch fast 3 weitere Wochen derart behandelt, daß ihm täglich zu seinem Futter zunächst eine Woche lang 0,1 bis 0,2 g pro die und für den Rest der Zeit 0,3 bis 0,4 g salzsaures Paraoxyphenyläthylamin pro die zugemischt wurde, so daß das Tier im ganzen 5,0 g dieser Substanz erhielt. Selbstverständlich wurde darauf geachtet, daß das Tier das Präparat auch wirklich mit den Körnern auffraß. Gleichwohl zeigten sich auch an dem Kamme dieses Tieres keine Veränderungen.

Aus diesen Beobachtungen an Hähnen geht somit hervor,

---

[1]) Münch. med. Wochenschr. 1912, Nr. 25.

daß auch bei wiederholter Zufuhr größerer Mengen von „Uteramin" per os wie subcutan — und zwar bei Mengen, die die therapeutische Dosis beim Menschen von 1 bis 2 ccm der 0,5 %igen Lösung bedeutend überschreiten — keinerlei gangräneszierende Wirkungen auftreten.

Wir kommen zu den Beobachtungen über die Kreislaufwirkung des Paraoxyphenyläthylamins.

Die Resultate unserer Versuche wollen wir vorwegnehmen und im Zusammenhang kurz schildern.

Die intravenöse Injektion von 1 bis 2 ccm einer 0,5 %igen Lösung dieser Substanz hat, wie unsere Experimente an Kaninchen und mittelgroßen Hunden ergaben, folgende Wirkungen. Der arterielle Blutdruck steigt nach einer gelegentlichen, rasch vorübergehenden leichten Senkung im unmittelbaren Anschluß an die Injektion rasch an und hält sich einige Zeit (2 bis 3 Minuten) auf dieser Höhe. Dann kehrt er wieder zur Norm zurück. Hand in Hand mit der Drucksteigerung geht eine Vergrößerung der Pulsamplitude und eine Bradycardie. Dieser Steigerung des arteriellen Blutdrucks entspricht eine Blutstauung im Arteriensystem infolge einer Verengerung der Capillaren und einer Blutverarmung des Venensystems. Das erstere ergibt sich daraus, daß die Tropfenzahl des aus einer in eine Vene peripherwärts eingebundenen Kanüle abfließenden Blutes fast momentan nach der Injektion abnimmt, ja daß sehr bald auch bei stärkeren Venen die Tropfenbildung überhaupt sistiert. Die Blutverarmung des Venensystems, die dadurch notwendigerweise entstehen muß, findet dann ihrerseits ihren weiteren Ausdruck in der Senkung des Venendrucks (gemessen an der Vena jugularis bei Kaninchen), die sehr beträchtlich ist, mit der Steigerung des Arteriendrucks parallel geht und mit seiner Rückkehr zur Norm ebenfalls verschwindet, meist jedoch nachdem zunächst vor der Rückkehr zu der Norm der Venendruck sich über die normale Höhe hinaus vorübergehend erhoben hat. Das ist eine Erscheinung, der wir umgekehrt bekanntlich bei einer vorübergehenden mechanischen Erschwerung des Blutabflusses aus den großen Venen nach dem Herzen zu begegnen.

Die weitere Folge der Blutverarmung des Venensystems muß eine Volumenabnahme aller derjenigen Organe sein, die

von Venen stark durchblutet sind. Das wird vor allem für den Uterus post partum zutreffen; direkt experimentell ließ sich diese Volumenabnahme — also eine Verkleinerung stark durchbluteter Organe nach der intravenösen Uterammininjektion — an der Niere zeigen. Die Nierenvolumenkurve sinkt, sobald der Arteriendruck steigt. Daß Extrakte aus Secale cornutum — wir bedienten uns des Secalan-Golaz — das gleiche tun, geht aus den unten mitgeteilten Kurven hervor, unter denen sich zudem eine findet, die die Volumenabnahme eines anderen Organs, nämlich des Darmes, nach der Secaleinjektion sehr schön demonstriert.

Es ist selbstverständlich, daß schon durch diese Veränderung in der Blutfülle und damit in dem Uterusvolumen ein Anreiz zu Contractionen der Uterusmuskulatur gegeben ist, und es findet dieses durch die klinischen Erfahrungen Heimanns auch volle Bestätigung.

Wenn wir diese gewaltigen Veränderungen, die die Uteramininjektion an den peripherischen Kreislauforganen erzeugt, berücksichtigen, so werden wir erwarten dürfen, daß auch der Contractionsablauf des Herzens, soweit er seinen mittelbaren Ausdruck an der Kurve des Elektrocardigramms findet, abgesehen von der schon erwähnten Verlangsamung der Herztätigkeit, Besonderheiten wird erkennen lassen.

In der Tat sahen wir bei systematischen Aufnahmen des Elektrocardiogramms des Kaninchenherzens, daß durch die Uterammininjektion einmal eine Verlängerung der Contractionsphase des Herzens auftritt, daß die J- und Jp-Zacken größer werden, daß die A-Zacke sich meist etwas verkleinert, während die F-Zacke ziemlich unverändert bleibt, manchmal die Tendenz einer Vergrößerung erkennen läßt.

Zum Schlusse seien als Beleg für unsere Ausführungen einige Kurven mitgeteilt. Da die zu einer Gruppe gehörigen Versuche unter sich stets so gut wie identisch verliefen, genügt es, aus einer jeden Gruppe ein Versuchsprotokoll mitzuteilen.

1. Versuche über den Einfluß des Uteramins auf den arteriellen Druck. Fig. 1 bis 4 zeigt den Ablauf der Wirkung am Carotispuls in seinen einzelnen Phasen. Die Kurve wurde mit dem Gad-Cowlschen Tonometer aufgenommen.

2. Versuche über den Einfluß des Uteramins auf den Venendruck. Bei den Venendruckversuchen wurde in die Vena jugularis von Kaninchen ein Wassermanometer, gefüllt mit physiologischer Kochsalzlösung, eingebunden. An der Skala des Manometers wurden die Druckveränderungen nach der Uteraminjektion in eine Ohrvene beobachtet. Z. B. trat nach der Injektion von 2 ccm der 0,5%igen Lösung bei einem Kaninchen

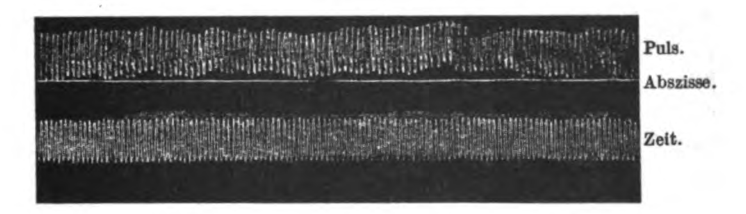


Fig. 1. Puls und Blutdruck der Art. carotis eines 2 kg schweren Kaninchens. Zeit $^1/_5$ Sekunde.

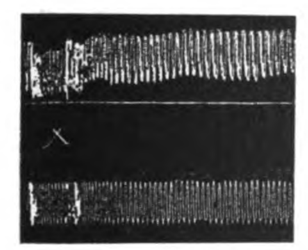


Fig. 2. × Injektion von 2 ccm 0,5% Uteraminlösung bei demselben Kaninchen intravenös.

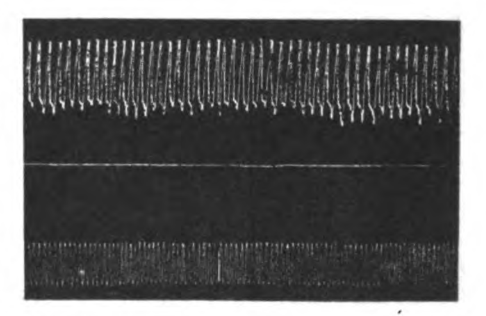


Fig. 3. 1 Minute nach der Injektion bei demselben Kaninchen.

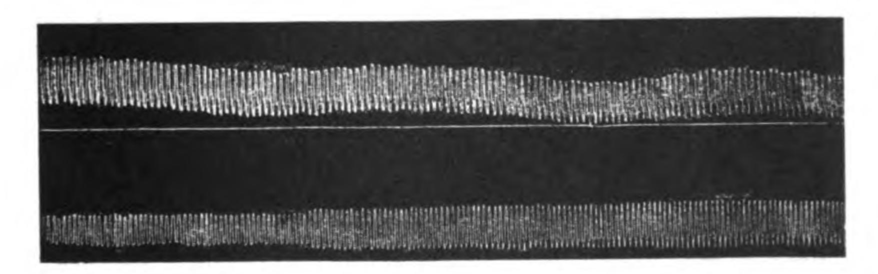


Fig. 4. 3 Minuten nach der Injektion bei demselben Kaninchen. Die Wirkung klingt ab.

von 1,5 kg Körpergewicht sofort eine allmählich fortschreitende Senkung bis zu 30 mm ein, dann erhob sich der Spiegel bis 7 mm über die Norm und kehrte dann zur Norm zurück. Die Ähnlichkeit mit der Adrenalinwirkung ist evident.

3. Versuche über den Einfluß des Uteramins auf die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes in den Capillaren.

Fig. 5 zeigt die Abnahme der Tropfenzahl des aus einem Seitenaste der Vena jugularis ausströmenden Blutes bei folgender Versuchsanordnung. In das Gefäß würde peripherwärts eine eingefettete Glaskanüle eingeführt. Das aus ihr tropfende Blut wurde auf einen an einem Mareyschen Tambour angebrachten geneigten Hebelarm tropfen gelassen, wobei aber die Tropfen nicht auf dem Hebel liegen blieben, sondern an ihm seitlich abglitten. Dieser Tambour war mit einem zweiten Tambour verbunden, der am Kymographion die Ausschläge aufzeichnete.

4. Versuche über den Einfluß des Uteramins und des Secalan-Golaz auf das Volumen von Niere und Darm. Die Versuchsanordnung war folgende: Die Art. femoralis eines mittelgroßen Hundes wurde mit dem Gad-Cowlschen Tonometer verbunden. Die Niere oder ein Stück abgebundenen und aus der Kontinuität losgelösten Dünndarms wurden in eine durch Fett ab-

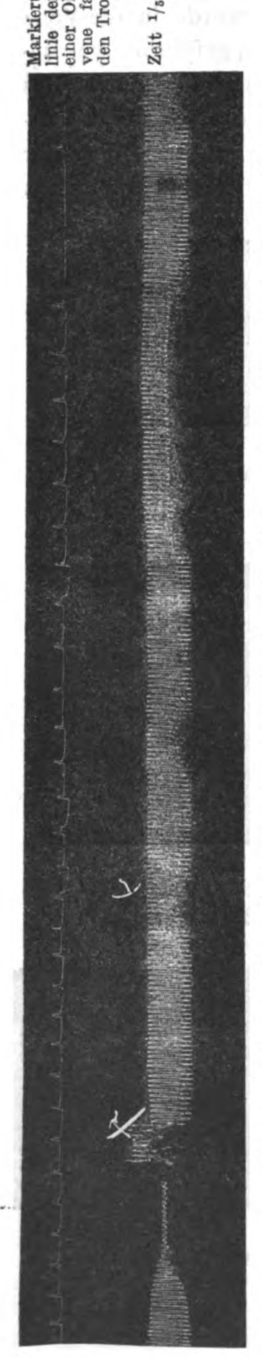


Fig. 5. ×× Injektion von 2 ccm Uteramin intravenös. Nach der Injektion fallen die Tropfen aus der in die Ohrvene eingeführten Kanüle langsamer.

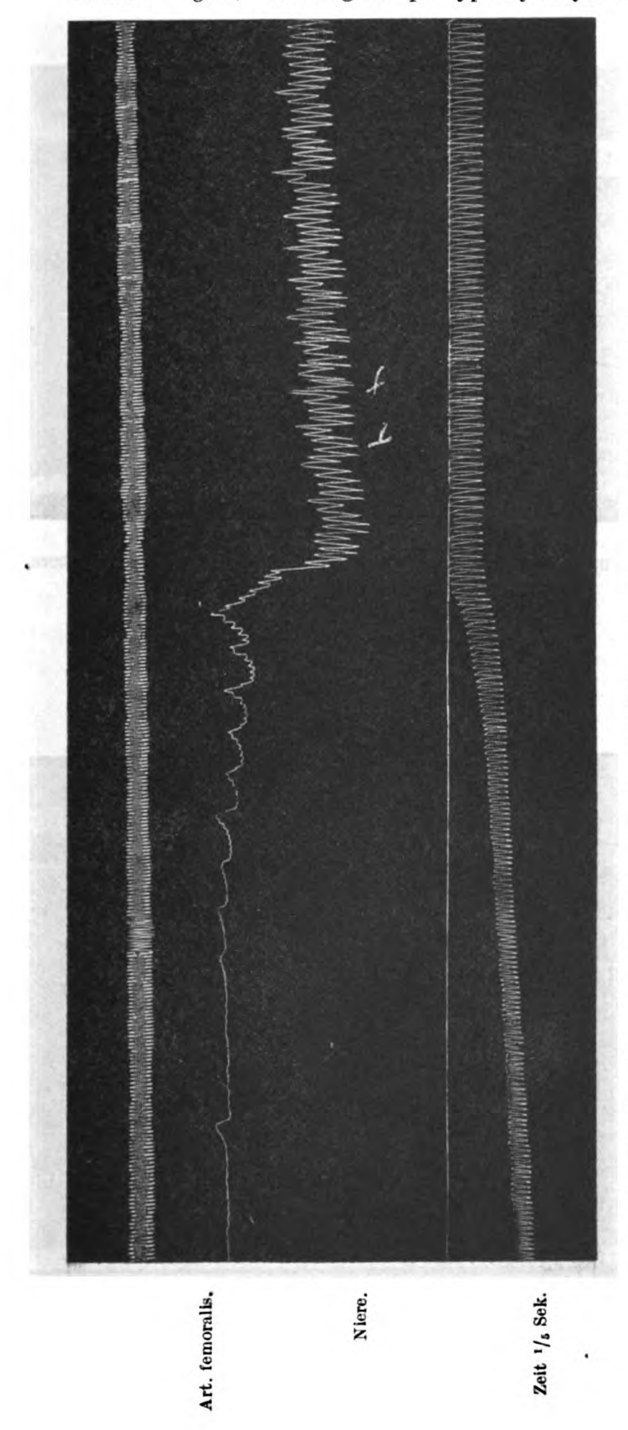


Fig. 6. Hund 6,5 kg. Bei ×× intravenöse Injektion von 1,0 ccm. 0,5 % Uteraminlösung.

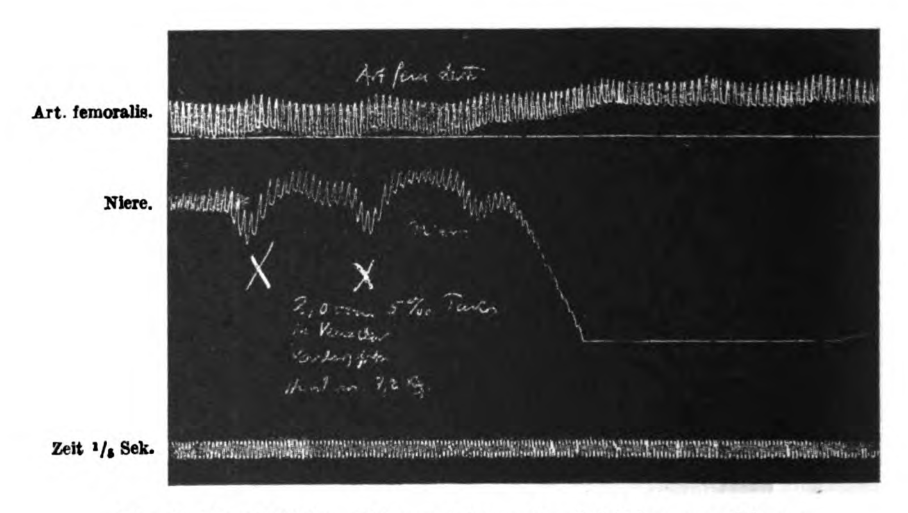


Fig. 7. Hund 7,2 kg. Bei ×× intravenöse Injektion von 2,0 ccm. 0,5 % Uteraminlösung.

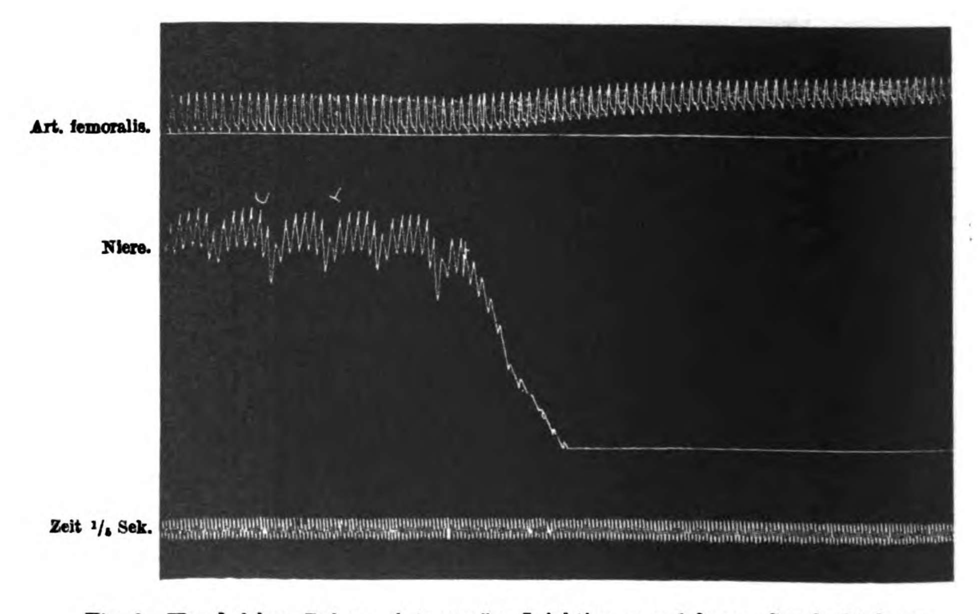


Fig. 8. Hund 6 kg. Bei ×× intravenöse Injektion von 1,0 ccm Secale-Dialysat.

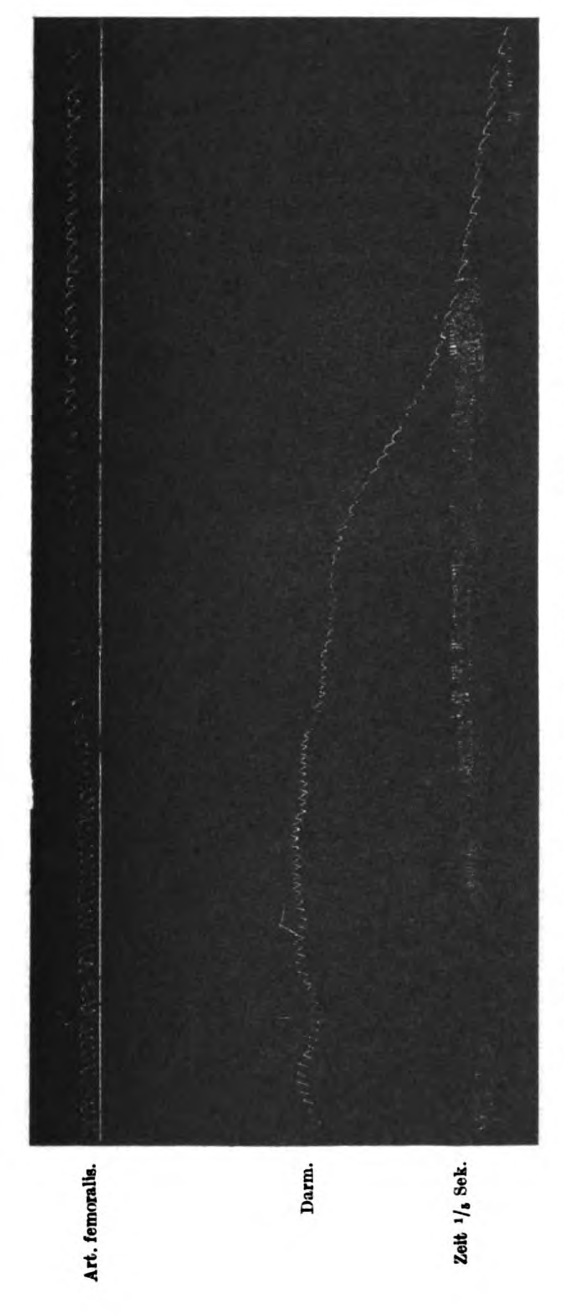


Fig. 9. Hund 7 kg. Bei ×× intravenöse Injektion von 2,0 ccm Secale-Dialysat.

geschlossene Kapsel eingeführt, ohne die zu- und abführenden Gefäße zu komprimieren. Der Luftinhalt der Kapsel wurde mit einem Mareyschen Tambour verbunden, der seine Bewegungen am Kymographion aufzeichnete. Erhebung dieser Kurve bedeutet Vergrößerung, Senkung hingegen Abnahme des Organvolumens. Aus den Kurven 6, 7, 8 und 9 geht hervor, daß sowohl nach der intravenösen Injektion in die Vorderbeinvene von 1 bis 2 ccm Uteramin (0,5 $^0/_0$ige Lösung), wie nach der intravenösen Injektion gleicher Dosen von Secalan-Golaz parallel mit dem Steigen der Carotiskurven eine Senkung der Organvolumenkurven geht.

Untersuchungen über den Kohlenstoffwechsel. Labiler und stabiler Kohlenstoff des Harns.

Von

Enrico Reale.

(Aus der I. medizinischen Klinik der Universität zu Neapel.)

(Eingegangen am 22. Oktober 1912.)

Mit 1 Figur im Text.

Das Studium des Harnkohlenstoffs ist im allgemeinen wenig vorgeschritten und hat bis jetzt keine Anwendung von Wert, besonders für die Praxis, gebracht. Wir wissen auf Grund der Untersuchungen deutscher und französischer Forscher, daß im menschlichen Harn täglich eine Menge von 9 bis 12 oder auch mehr Gramm C enthalten ist, mit einem Gesamtstickstoffverhältnis (Quotient C/N), das im allgemeinen zwischen den Grenzen von ca. 0,65 bis 0,85, die nur ausnahmsweise überschritten werden können, schwankt.

Außerdem ist bekannt, daß ungefähr die Hälfte des C dem Harnstoff zukommt, dem Endprodukt des Eiweißstoffwechsels und daß darum nur dieser Teil des C des Harns, — wie Magnus-Alsleben[1]) zeigt —, neben die aus den Lungen ausgeatmete Kohlensäure gestellt werden kann, während der übrige C des Harns in Verbindungen enthalten ist, die im allgemeinen nicht als Endprodukte des Stoffwechsels angesehen werden können[2]).

---

[1]) E. Magnus-Alsleben, Über die Ausscheidung des Kohlenstoffs im Harn. Zeitschr. f. klin. Med. 68, 1909.

[2]) Spiro hat schon früher vorgeschlagen, die Menge desjenigen N, der nicht als Harnstoff und Ammoniak, und desjenigen C, der nicht als Harnstoff ausgeschieden ist, mit den Namen dysoxydabler Stickstoff und dysoxydabler Kohlenstoff zu bezeichnen.

Das Verhalten des Kohlenstoffs und seine Beziehung zum Gesamtstickstoff des Harns ist bis jetzt in Italien noch nicht studiert worden. Darum habe ich es für nötig gehalten, mich vor allen Dingen mit allen diesbezüglichen Einzelheiten zu beschäftigen.

Der Hauptzweck meiner Arbeit ist aber, ein Trennungsmittel einer oder mehrerer Fraktionen des Harnkohlenstoffs ausfindig zu machen.

Im folgenden wird zuerst die Technik der Versuche beschrieben.

I. Technik.

Was die Methode der Analyse anbetrifft, so habe ich die Verbrennung auf nassem Wege mittels einer Chrom- und Schwefelsäuremischung ausgeübt.

Die von mir gewählte Methode ist die gleiche wie bei Desgrez[1]) mit dem von diesem Autor konstruierten Apparat (geliefert von Adnet, Paris), von dem ich die Figur beifüge.

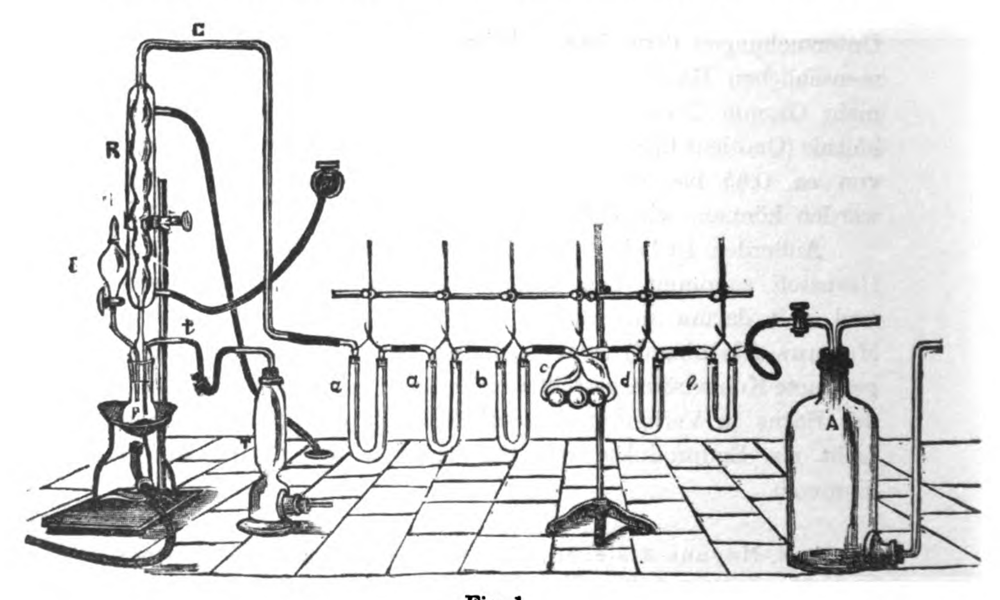


Fig. 1.

[1]) A. Desgrez, Dosage du carbone total dans les produits d'élimination. Compt. rend. Soc. Biol., séance du 18 décembre 1897.

Das Prinzip, worauf sich die Methode gründet, ist folgendes:
Die organischen Substanzen, mit Chrom- und konzentrierter Schwefelsäure erwärmt, verbrennen, so daß aller C in CO_2 umgewandelt wird, während die Chromsäure in schwefelsaures Chromsalz übergeht, wobei sich reichlich Sauerstoff entwickelt.

Der Apparat (Fig. 1) setzt sich zusammen: aus einem Kolben (*P*) von 100 ccm Inhalt mit breitem, innen eingeschliffenem Hals (er muß ein wenig über dem Glasschliff erhöht sein, so daß über dem dazu gehörenden Glasstopfen ein kleiner Raum bleibt). Durch den Stopfen geht 1. ein senkrechter Kühler (*R*) mit angeblasenen Kugeln zur Verdichtung des Wasserdampfes, 2. ein rechtwinklig gebogenes Rohr (*t*), das am Schluß der Operation den nötigen Luftstrom zuzuführen hat, um die im Apparat gebliebene Kohlensäure abzusaugen; die Luft (die durch einen mit Natronkalk [ein Gemenge von Calciumhydrat und Natriumhydrat] gefüllten Trockentum (*T*) passiert[1]) ist von ihrem CO_2-Gehalt befreit; 3. ein Scheidetrichter mit eingeschliffenem Hahn (*J*), der zum Einfüllen der Chrom- und Schwefelsäure in den Kolben dient.

Der Kühler verlängert sich in ein zweimal rechtwinklig gebogenes Rohr (*C*), durch das die bei der Reaktion entwickelten Gase streichen müssen, und zwar zuerst durch zwei Chlorkalk-U-Röhren (*a a*), wobei sie getrocknet werden, darauf durch eine andere U-Röhre (*b*). die zur Hälfte mit Ferrocyankalium, zur anderen Hälfte mit trockenem Borax gefüllt ist um das Chlor und die Salzsäure zu binden ($K_4FeCy_6 + Cl = KCl + K_3FeCy_6$). An diese Röhren schließt sich der vorher gewogene Liebigsche oder Geißlersche Apparat an, der die konzentrierte Kaliumhydratlösung (1 Teil KOH auf 2 Teile H_2O) enthält, der zur Absorption der CO_2 dient, die sich durch die Verbrennung des Harns entwickelt. Darauf folgt ein anderes, auch vorher gewogenes, mit Natronkalk und Chlorkalk gefülltes Rohr, das die letzten Spuren der Kohlensäure und Feuchtigkeit festzuhalten hat[1]). Der Apparat endigt mit einem nicht gewogenen Rohr, das zu gleichen Teilen Natronkalk und Chlorkalk enthält, um die Feuchtigkeit und die Kohlensäure der Außenluft zu absorbieren.

Nachdem 10 ccm Harn in den Kolben eingefüllt sind, wird er mit dem Apparat verbunden; der leere Raum über dem Stopfen (von dem oben gesprochen war), wird mit Schwefelsäure gefüllt, so daß ein hermetischer Verschluß hergestellt wird. Darauf läßt man durch den Scheidetrichter 8 bis 10 g Chromsäure (Anhydrid CrO_3) in einer möglichst geringen Menge Wasser gelöst, und endlich 30 ccm konzentrierte Schwefelsäure tropfenweise einlaufen. Man muß acht geben, daß die Gasentwicklung regelmäßig ist, und darum, während der Hahn geschlossen ist, den Kolben nur mit einer kleinen Stichflamme (à vieulleuse) so weit erwärmen, daß man die Bläschen zählen kann. Nur gegen Ende

[1]) An Stelle des Kaliapparates kann auch ein anderes U-Rohr, mit Natronkalk und Chlorcalcium gefüllt, verwendet werden. Ich habe die von Dennstedt eingeführten Formen der U-Röhren gebraucht.

der Gasbildung, die ungefähr 3 Stunden dauert, erhöht man die Temperatur bis zum Sieden der Mischung. Dann unterbricht man die Erwärmung und läßt ungefähr eine halbe Stunde langsam, vermittels des Aspirationsapparates, einen Luftstrom durchgehen. Der Gewichtsunterschied des Kaliapparats und des Natronkalkrohrs gibt die Menge der CO_2 an; diese, multipliziert mit dem Faktor 0,2727, gibt die Menge des C in 10 ccm Harn, und dieselbe, multipliziert mit 100, den Gehalt an Kohlenstoff pro Liter an.

Im allgemeinen ist die Verbrennung auf nassem Wege mit dieser Methode vollständig; wenn man die Endröhre des Apparats mit einem kleinen Gaswaschfläschchen, gefüllt mit ein wenig Palladiumchlorürlösung (2 ‰), verbindet, ist keine Trübung, höchstens mitunter eine kaum merkbare Schwärzung, die von einer sehr geringen Menge Kohlenoxyd herrührt, bemerkbar.

Ich füge noch hinzu, daß am Beginn der Untersuchungen mehrere Bestimmungen mit der sogenannten vereinfachten Elementaranalyse nach Dennstedt[1]) ausgeführt wurden, die darin besteht, die Substanz in einer Glasröhre zu verbrennen, mit dem Unterschied, daß die Verbrennung während der ganzen Dauer unter Sauerstoffdurchleitung und mit einem Platinstern, der als Katalysator wirkt, vor sich geht. Dadurch wird eine geringe Erwärmung bedingt mit nur 2 bis 3 Bunsenbrennern; die Untersuchung ist in 3 Stunden beendigt.

Zur Bestimmung des C im Harn wird letzterer (2 ccm) in einem Porzellanschiffchen mit reinem Bleichromat gemischt, in demselben Rohr eingetrocknet und bis zur vollständigen Verbrennung erhitzt.

Die Methode gibt gute Resultate, aber ist nicht so empfehlenswert wie die auf nassem Wege, weil das Trocknen des Harns einen Druck des Wasserdampfes hervorruft, und oft ist dieses die Ursache des Platzens der Röhren.

Im übrigen weisen die Resultate, die man mit beiden Methoden erhält, keine bemerkenswerten Unterschiede auf, so fand ich z. B. in einem Harn nach der Dennstedtschen Methode 9,517 g C und nach der Desgrezschen 9,492 g C pro Liter.

Damit die Methode der Verbrennung auf nassem Wege gute Resultate gibt, ist es durchaus notwendig, noch folgendes zu beachten. Vor allen Dingen muß die Schwefelsäure von organischen Substanzen frei sein (mit Chromsäure erwärmt, darf man keine Kohlensäureentwicklung bemerken); zweitens darf kein alkalisch reagierendes Chlorcalcium gebraucht werden, das Ätzkali enthält und die Kohlensäure binden könnte.

Was die Methoden, die ich für die anderen quantitativen Bestimmungen angewandt habe, betrifft, so ist für den Gesamtstickstoff die Kjeldahlsche, für das NH_3 die Schlösing-

[1]) M. Dennstedt, Anleitung zur vereinfachten Elementaranalyse. Hamburg 1910, Meißners Verlag.

Neubauersche, für den Harnstoff die Mörner-Sjöqvistsche, für das P_2O_5 die Neubauersche, für den Gesamtschwefel die von Schulz verbesserte Mohrsche Methode gebraucht worden.

II. Der Kohlenstoff und sein Verhältnis zum Stickstoff.

Meine Beobachtungen sind an zwei Krankenwärtern der Klinik, beide gesund und bei frei gewählter Kost, ausgeführt worden. Die erhaltenen Resultate sind in den ersten 3 Tabellen kurz zusammengefaßt. Aus ihnen geht hervor, daß die tägliche Quantität C im Harn durchschnittlich 10,611 g und der Quotient C/N 0,74 betrug. Beachtenswert scheint mir folgendes: eine der Personen befand sich an einem Tage im Stickstoffgleichgewicht; die hierbei erhaltenen Zahlen unterschieden sich wenig, wie die Tabelle zeigt, von den obenerwähnten Durchschnittsziffern.

Wie sich der Harnstoff-C verhält, ergeben die am selben Tage an derselben Person gemachten Untersuchnngen, und zwar, daß auf 14,617 g Gesamtstickstoffs innerhalb 24 Stunden 11,997 g dem Harnstoff (25,66 g) zuzuschreiben sind, dem eine Kohlenstoffmenge von 5,1326 g, das wäre 47% des totalen C, zugehört.

Wenn man von dem an den Harnstoff nicht gebundenen N (2,625 g) denjenigen des Ammoniaks (gleich 0,125 g) abzieht, so hat man gegenüber den übriggebliebenen 2,50 g N (gleich 17% des ganzen N) 5,7854 g des nicht an Harnstoff gebundenen C, das heißt 53% des totalen C.

Diese Zahlen stimmen nach meiner Meinung mit den von Meißl[1]), Pflüger[2]), Kellner, Tangl[3]), Spiro[4]) usw. gefundenen Tatsachen überein, daß dieser Überschuß an C nicht

---

[1]) Meißl, Untersuchungen über den Stoffwechsel des Schweines-Zeitschr. f. Biol. 1886.

[2]) Pflüger, Unsere Kenntnisse über den Kraftwert des Fleisches und der Eiweißstoffe. Arch. f. d. ges. Physiol. 1900.

[3]) J. Tangl, Beiträge zur Kenntnis des Energiegehaltes des menschlichen Harns. Arch. f. Anat. u. Physiol. Phys. Abteilung, Supplement 1899.

[4]) K. Spiro, Zur Lehre vom Kohlenhydratstoffwechsel. Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol. 1907 — Über das Verhältnis vom dysoxydablen Kohlenstoff zu dysoxydablem Stickstoff bei verschiedener Ernährung. Beiträge zur chem. Physiol u. Pathol. 1908.

nur von stickstoffhaltigen Substanzen, (wie Pregl[1]) vor mehreren Jahren behauptete), herrührt, sondern auch von den Kohlenhydraten und Fetten.

Um einen weiteren Beitrag zu diesem Studium zu bringen, habe ich bei dem Krankenwärter L. S. vergleichende Experimente zwischen dem Quotienten $\frac{C}{N}$ und der Quantität des Schwefels und Phosphors im Harn während fünf Perioden, jede mit verschiedener Kost und je drei Tage dauernd, gemacht. Die Resultate dieser Experimente (verkürzt zusammengefaßt in vorliegender Tabelle) zeigen klar, daß keine Beziehungen zwischen dem obengenannten Quotienten und der Quantität des Schwefels und des Phosphors im Harn bestehen, was sicher der Fall sein müßte, wenn der C ausschließlich von Eiweißsubstanzen herrühren würde. Zusammenfassung: Die Hälfte des Harnkohlenstoffs ist an Stickstoff- und nicht stickstoffhaltige Zwischenprodukte des Stoffwechsels gebunden, die sich durch die chemische Zusammensetzung, durch den Ursprung, durch den verschiedenen Grad ihrer katabolischen Phase usw. unterscheiden; Gründe, die mich veranlaßt haben, die Trennung einiger spezieller Fraktionen zu versuchen, wegen des erhöhten und komplizierten Verhältnisses des an den Harnstoff nicht gebundenen C.

III. Trennungsmittel einiger spezieller Fraktionen des Harnkohlenstoffs.

Hierbei bin ich zu folgenden Resultaten gekommen:

Wenn man den Harn (je nach der Dichtigkeit 10 bis 50 ccm) mit 50% Wasserstoffsuperoxyd (ich habe mich des Perhydrols von Merck bedient) und mit einem Katalysator, der die Zersetzung beschleunigt (unter letzteren ist das Mangansuperoxyd, MnO_2, von dem man nur wenige Körnchen nimmt, am geeignetsten), behandelt, beobachtet man eine mehr oder weniger starke Entwicklung von Gasbläschen, der reichlicher Schaum folgt, so daß mitunter das Gefäß, das die Mischung enthält, überläuft.

---

[1]) J. Pregl, Über die Ursachen der hohen Werte des $\frac{C}{N}$-Quotienten des normalen menschlichen Harnes. Arch. f. die ges. Physiol. 1899.

Die Eigenschaften des Harns verändern sich nach und nach sehr. Die Veränderung, die zuerst auffällt und die zu erwarten war, ist die Farbe.

Dunkelrot gefärbte Harne (VI. und VII. Grad nach der Vogelschen Skala), sehr reich an Uroerythrin, werden allmählich heller und nach einigen Tagen vollständig farblos wie Wasser. Wichtig ist die Wirkung auf ikterische Harne, die, sobald sie in Verbindung mit Wasserstoffsuperoxyd gekommen sind, eine schöne grüne Farbe annehmen (durch den bekannten Übergang des Bilirubins in Biliverdin), dann werden auch sie nach und nach farblos.

Diese Tatsachen führe ich nur deshalb an, weil sie, obwohl sie das Thema, um das es sich hier handelt, nicht direkt berühren, von Wichtigkeit für urologische Forschungen sein könnten.

Was das Thema selbst anbetrifft, so ist der Nachweis merklicher Mengen CO_2 unter den entwickelten gasförmigen Produkten hervorzuheben. Wenn man den Harn in ein geschlossenes Gefäß bringt und in gewohnter Weise und größter Vorsicht die Gase durch Kalkwasser, das sich in einer Woulfschen Flasche mit zwei Hälsen befindet, hindurchperlen läßt, so kann man beobachten, daß das Kalkwasser nach 3 bis 6 Stunden trübe zu werden beginnt. Hierbei entsteht ein weißer, in Salzsäure löslicher Niederschlag.

Die Trübung schreitet nach und nach fort und vermehrt sich, wenn man einige Minuten von CO_2 befreite Luft (vermittels eines Natronkalkturmes) hindurchleitet. Wenn man nach 24 Stunden das trübe Kalkwasser wegnimmt und wechselt, erscheint die Trübung von neuem und ebenso am nächsten und eventuell den folgenden Tagen, bis die CO_2-Entwicklung aufhört.

Übereinstimmende Resultate haben die Bestimmungen des Kohlenstoffs der der Wirkung des Wasserstoffsuperoxyds unterworfenen Harne gegeben. Der Versuch wird folgendermaßen ausgeführt:

A. Wenn man in 10 bis 50 ccm Harn die Kohlenstoffmenge bestimmt hat, gießt man in drei Gläser je die gleiche Menge Harn, Perhydrol Merck (die Hälfte des Harnvolumens) und 4 bis 5 Mangansuperoxydkörnchen (in Hirsekorngröße). Die

Gläser bleiben dann bei gewöhnlicher Temperatur stehen. Man prüft in den folgenden 2 bis 3 Tagen nacheinander den C-Gehalt jeden Glases und findet, daß der Kohlenstoff sich allmählich vermindert[1]).

Der Verlust des Kohlenstoffs kann 2 bis 3 g und mehr pro Liter betragen, je nach der Dichtigkeit des Harnes, dem Ursprung usw.

B. Man bringt (10 bis 50 ccm) Harn mit einigen Körnchen MnO_2 in den Kolben des Desgrezschen Apparats und läßt durch einen Scheidetrichter mit Hahn 20 ccm H_2O_2 einlaufen. Nach 24 Stunden läßt man langsam einen Luftstrom hindurchgehen, bestimmt die absorbierte Kohlensäuremenge und darauf den zerstörten Kohlenstoff.

Der Verlust schwankt zwischen den oben angegebenen Grenzen.

Nachdem sich gezeigt hatte, daß eine Verbrennung einer gewissen Menge C stattfindet, mußte man die Bedingungen feststellen, unter denen die Wirkung des H_2O_2 und MnO_2, ohne den Harnstoff anzugreifen, erhöht werden könnten. Die diesbezüglichen Beobachtungen haben gezeigt, daß, wie zu erwarten war, die Temperaturerhöhung einen großen Einfluß auf die Reaktion ausübt. Und in der Tat, wenn bei gewöhnlicher Temperatur die Entwicklung der CO_2 schon aufgehört hat, beginnt, wenn man den Harnstoff und die Wasserstoffsuperoxydmischung erwärmt (Experimente zu A und B), die Gasentwicklung von neuem und man kann leicht die weiter oxydierte C-Menge bestimmen.

Die Erwärmung darf man nicht mit einer freien Flamme vornehmen, da der so behandelte Harnstoff sich zersetzt. Die wässerigen Harnstofflösungen (1 bis 3%ig) verändern sich bei einer solchen Behandlungsweise. Das Thermometer, in das den Harn enthaltende Rohr oder den Kolben gestellt, steigt bis 105°, während die auf dem Wasserbad auf 100° erwärmten Lösungen nicht zersetzt werden.

[1]) Ich habe untersuchen wollen, wie sich der Harnstickstoff unter der Wirkung von H_2O_2 verhält. Bei den Untersuchungen unter den oben besprochenen Bedingungen erkennt man, daß die Menge des Gesamt-N sich nicht verändert. Daraus darf man aber nicht schließen, daß H_2O_2 keinen Einfluß auf die stickstoffhaltigen Körper des Harns hat.

Im nächsten Versuch wurden 0,046 g Harnstoff in 10 ccm destilliertem Wasser gelöst. Diese Lösung wird in den Kolben des Desgrezschen Apparats mit 4 bis 5 Körnchen MnO_2 getan, darauf fügt man 5 ccm H_2O_2 hinzu und erwärmt 3 Stunden im Wasserbade, wie oben angegeben ist.

Die Resultate sind folgende:

80 g = 12,9107 + Natronkalkrohr I,
80 g = 12,9107 + „
0,0000

70 g = 11,2431 + Natronkalkrohr II
70 g = 11,2425 + „
0,0006

Demnach hat sich noch keine CO_2 entwickelt[1]).

Methode der quantitativen Bestimmung des verbrennbaren C mittels $H_2O_2 + MnO_2$.

Auf Grund der Resultate der oben berichteten Untersuchungen ist die quantitative Bestimmung dieser Fraktion des Harnkohlenstoffs folgendermaßen ausgeübt worden:

Nachdem man den Desgrezschen Apparat, wie in der Figur gezeigt ist, vorbereitet hat, gießt man zuerst in den Kolben 10 bis 30 ccm Harn und 3 bis 4 Körnchen MnO_2. Darauf läßt man 5 bis 15 ccm Perhydrol durch den Scheidetrichter einlaufen; nachdem letzterer geschlossen ist, setzt man ein kleines Wasserbad unter den Kolben, so daß derselbe bis an den Hals eintaucht. Dann erhitzt man ihn bis zum Sieden während $3^1/_2$ Stunden; nachdem die Flamme entfernt worden ist, beginnt man Gas durchzusaugen, indem man während $^1/_2$ Stunde den Luftstrom sehr langsam durch den Apparat gehen läßt. Jetzt hat man nur die Apparate zu wiegen und die Menge des in dem Harn enthaltenen C zu berechnen.

Die übriggebliebene Quantität des Kohlenstoffes bestimmt man, indem man in gewohnter Weise eine Chrom-Schwefelsäuremischung auf den im Kolben sich befindenden Harn gießt und mit freier Flamme erwärmt. Indem man ihn durch die Differenz des Gesamt-C des Harns berechnet, werden übereinstimmende Resultate, wie untenstehende Angaben erläutern, erhalten. Daher ist es unnötig, die direkte Bestimmung des Kohlenstoffrestes zu machen.

Harn des Kranken Bett Nr. 1. Menge 1355 ccm. Spez. Gewicht 1021 g. Glucose nicht anwesend.

Bestimmung des Gesamt-C mit Chromsäure und Schwefelsäure nach Desgrez (in 10 ccm):

---

[1]) Thenard erklärt in bezug auf die verschiedene Wirkung, die die Körper auf die Zersetzung des H_2O_2 ausüben, daß unter den organischen Substanzen der Harnstoff ohne Einfluß ist (Friedheim, Anorganische Chemie 1, 133).

80 g = 11,5585 + Geißlerscher Kaliapparat
80 g = 11,2452 + " "
0,3133 CO_2

60 g = 11,6226 + Natronkalkrohr
60 g = 11,6051 + "
0,0175 CO_2

Im ganzen haben die 10 ccm Harn 0,3308 g CO_2 ergeben, gleich 0,09020 g C; infolgedessen pro Liter 9,020 g C.

Bestimmung des durch $H_2O_2 + MnO_2$ in 10 ccm Harn vermittels desselben Desgrezschen Apparates angreifbaren Kohlenstoffes:

70 g = 3,9109 + Natronkalkrohr I
70 g = 3,8119 + "
0,0990 CO_2

70 g = 11,3480 + Natronkalkrohr II
77 g = 11,3401 + "
0,0079 CO_2

Im ganzen haben 10 ccm Harn 0,1069 g CO_2 ergeben, gleich 0,02915 g C; in einem Liter 2,915 g C, was 32,3 % des Gesamt-C ausmacht.

Bestimmung des nicht durch $H_2O_2 + MnO_2$ angreifbaren Kohlenstoffes mittels Chromsäure + Schwefelsäure:

70 g = 3,8719 + Natronkalkrohr I
70 g = 3,6733 + "
0,2086 CO_2

70 g = 11,3401 + Natronkalkrohr II
70 g = 11,3240 + "
0,0160 CO_2

Im ganzen haben 10 ccm Harn 0,2247 g CO_2 ergeben, gleich 0,06127 g C, infolgedessen pro Liter 6,127 g C, der nicht durch H_2O_2 angegriffen wird, d. h. 62,5 % des Gesamt-C. Der Gesamtkohlenstoff direkt bestimmt pro Liter beträgt 9,020 g.

Der berechnete Gesamtkohlenstoffgehalt (aus dem mit H_2O_2 oxydablen und den nicht angegriffenen Teilen zusammenaddiert) ergibt sich zu 9,022, mithin die Differenz zwischen den berechneten und gefundenen Werten:

$$\begin{array}{r} 9{,}022 \\ -\,9{,}020 \\ \hline 0{,}002\text{ g.} \end{array}$$

Die Resultate dieser Experimente führen zu dem Schlusse, daß in dem Harn eine Fraktion des in dem Harnstoff nichtgebundenen C besteht, die sich vom Sauerstoff in statu nascendi angreifen läßt und sich deutlich vom übriggebliebenen C, der

sich nur durch die vollständige Verbrennung des Harns ermitteln läßt, unterscheidet.

Unter labilem C verstehe ich den Anteil, der sich mittels H_2O_2 verbrennen läßt, unter stabilem C den Rest.

Die Bezeichnungen lehnen sich an die für den Eiweißschwefel gebräuchlichen an (labiler resp. stabiler Schwefel).

Welche nützliche Anwendung könnten die Studien des labilen C bieten?

Das ist bis jetzt schwer zu sagen. Um die Bedeutung genau festzustellen, hat man noch ein weites Ziel vor sich. Man muß noch die Körper, die direkt oder indirekt in den beiden Anteilen enthalten sind, genauer untersuchen, sowie auch Studien über die physiologischen (Alter, Geschlecht, Ernährung, Ruhe, Arbeit, Anstrengung usw.) und pathologischen Bedingungen anstellen, die die Ausscheidung verändern.

Eine Fraktion des Harnkohlenstoffs bewerkstelligt zu haben, ist aber der erste Schritt für die Lösung der Probleme der Physiopathologie der Ernährung und die Diagnostik[1][2][3][4].

Bestimmung des täglichen Harnkohlenstoffs bei gesunden Personen.

I.

Krankenwärter G. C. 38 Jahre.

Kohlenstoff g	Stickstoff g	$\frac{C}{N}$
8,823	13,408	0,6582
10,087	12,648	0,7975
10,940	13,872	0,7165
10,770	12,900	0,8348
Durchschnittszahlen:		
10,205	13,207	0,7517

[1]) S. Bondzynski und R. Gottlieb, Centralbl. f. med. Wiss. 1897.

[2]) Ch. Bouchard, Répartition comparative dans les diverses émonctoires, de l'azote et du carbone de l'albumine elaborée. Compt. rend. Soc. Biol., séance du 6 nov. 1897.

[3]) Ch. Bouchard, Carbone urinaire et coefficients urinaires. Journ. de Physiol. et Pathol. gén. 1899.

[4]) Voit, Die Gesetze der Zersetzung der N-haltigen Stoffe im Tierkörper. Zeitschr. f. Biol. 1865.

II.

Krankenwärter L. S. 24 Jahre.

Kohlenstoff g	Stickstoff g	$\frac{C}{N}$
11,340	15,870	0,714
11,978	15,620	0,766
11,529	16,506	0,698
8,471	13,542	0,6255
7,989	12,951	0,6168
12,281	15,510	0,8259
9,290	12,978	0,7158
12,807	15,654	0,8181
	Durchschnittszahlen:	
10,711	14,828	0,7225

Bestimmung des C bei einer gesunden Person. Alter 24 Jahre, Körpergewicht 59 kg, Stickstoffgleichgewicht.

Krankenwärter L. S.

Calorienwert der Nahrung (Calorien netto)	Stickstoff d. Nahrung g	Stickstoff der Faeces g	Unterschied zwischen N d. Nahrung u. N d. Faeces (absorb. N) g	Harnstickstoff g	Unterschied zwischen absorbiertem N und Harnstickstoff g	Harnkohlenstoff g	$\frac{C}{N}$
2600	16	1,469	14,531	14,617	0,086	10,918	0,7462

Quotient $\frac{C}{N}$ in bezug auf Schwefel und Phosphor.

(Durchschnitt der 5 Perioden der Experimente.)

Perioden	$\frac{C}{N}$	Gesamt-S (H_2SO_4)	Gesamt-P (P_2O_5)
1	0,7866	3,792	2,070
2	0,7379	4,382	2,048
3	0,7342	4,260	2,005
4	0,7740	4,291	2,182
5	0,7622	4,616	2,060

Allgemeiner Durchschnitt der Untersuchungen über den täglichen Harn bei gesunden Personen.

Kohlenstoff g	Stickstoff g	$\frac{C}{N}$
10,611	14,217	0,74

Über die Milchsäurebildung bei der antiseptischen Organautolyse.

Von

Nicolaus Ssobolew.

(Ausgeführt unter Leitung des a. ö. Professors Dr. O. v. Fürth im Physiologischen Institut der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 13. November 1912.)

Mit 1 Figur im Text.

Es ist seit langer Zeit bekannt, daß die postmortale Säuerung der Organe auf Milchsäurebildung beruht und daß die so vielfach studierte postmortale Säurebildung im Muskel nichts anderes als einen speziellen Fall dieses Vorganges darstellt, der im allgemeinen als Fortsetzung eines vitalen Prozesses angesehen wird. Aus zahlreichen Untersuchungen über die aseptische und antiseptische Autolyse geht zur Genüge hervor, daß es sich dabei um einen enzymatischen Vorgang handelt und daß die dabei in Erscheinung tretende Säure als d-Milchsäure anzusehen ist. Gelegentliche Beobachtungen über das Auftreten inaktiver Gärungsmilchsäure dürften durch die Mitwirkung von Mikroorganismen ausreichend erklärt sein.

Was den Ursprung der Milchsäure betrifft, vermochte Türkel[1]) im Wiener physiologischen Institute zu zeigen, daß eine glykogen- und zuckerfreie Leber kaum weniger Milchsäure liefert als eine glykogenhaltige, und daß auch Zusatz von Alanin und Inosit keinen wesentlichen Ausschlag in bezug auf die

---

[1]) R. Türkel, Die Milchsäurebildung bei der Autolyse der Leber. Diese Zeitschr. 20, 431, 1909.

Milchsäurebildung gibt. Ähnliche Beobachtungen liegen auch aus Salkowskis Laboratorium vor[1]). Zusammengehalten mit den Beobachtungen Embdens[2]) an kohlenhydratfreien Muskelpreßsäften, sowie denjenigen Fletschers[3]) an zerkleinerten Muskeln und mit Versuchen aus Salkowskis Laboratorium ergibt sich die Schlußfolgerung, daß die postmortale Säurebildung auf Kosten einer unbekannten Vorstufe, des „Lactazidogens" Embdens erfolgt. Neuere Untersuchungen, insbesondere Embdens und seiner Mitarbeiter[4]), lassen es sehr wahrscheinlich erscheinen, daß, ebenso wie der Zucker durch Alkaliwirkung mit der größten Leichtigkeit zur Milchsäure aufgespalten wird, auch die physiologische Glykolyse über die Milchsäure verläuft. Anscheinend dürfte ein Teil der im Organismus durch Zuckerspaltung entstandenen Milchsäure zu „Lactazidogen" umgewandelt worden sein, das wiederum freie Milchsäure liefern kann.

Eine Reihe von Untersuchungen, insbesondere solche aus Salkowskis Laboratorium und aus dem medizinisch-chemischen Institute zu Tokyo[5]) machen es wahrscheinlich, daß neben der Milchsäurebildung in den Geweben auch Vorgänge der Milchsäurezerstörung einhergehen, die ein besonderes physiologisches Interesse für sich in Anspruch nehmen.

Es ergibt sich nun die Frage, ob wir berechtigt sind, auch die Milchsäurezerstörung in den Organen auf einen enzymatischen Vorgang zurückzuführen. Die in dieser Richtung vorliegenden Beobachtungen erscheinen aus mehrfachen Gründen nicht ganz eindeutig. Salkowski hat die Aufmerksamkeit auf den Umstand gelenkt, daß man die Schwierigkeit, die Interferenz von Mikroorganismenwirkungen bei Autolysever-

---

[1]) G. Stein, diese Zeitschr. **40**, 486, 1912.

[2]) G. Embden und Fr. Kraus, XXVI. Kongr. f. innere Med. 1909. — G. Embden, Fr. Kalberlah und H. Engel, diese Zeitschr. **45**, 58, 1912.

[3]) Fletscher, Journ. of Physiol. **43**, 286, 1911.

[4]) Embden und Mitarbeiter, diese Zeitschr. **48**, Heft 1 bis 2, September 1912.

[5]) Saito und Yoshikawa, Zeitschr. f. physiol. Chem. **62**, 1909. — Mochizuki und Arima, Zeitschr. f. physiol. Chem. **49**, 108. — Inouye und Kondo, Zeitschr. f. physiol. Chem. **54**, 481.

suchen auszuschließen, früher ganz bedeutend unterschätzt hatte, und daß es auch bei Zusatz von Antisepticis der peinlichsten Einhaltung bestimmter Kautelen bedarf, um eine Trübung der Versuchsresultate zu vermeiden.

Eine bis vor kurzem aber gänzlich übersehene, wichtige Fehlerquelle bei der Milchsäurebestimmung in Organen ist von Mondschein[1]) im Wiener Physiologischen Institute aufgedeckt worden. Es hat sich nämlich herausgestellt, daß die bisher vorliegenden Angaben über den Milchsäuregehalt der Muskeln und anderer Organe zu klein erscheinen, da etwa ein Drittel der vorhandenen Milchsäure beim Auskochen des Gewebes infolge Eiweißbindung im Koagulum verbleibt und der Bestimmung entgeht. Zwar kann die im Kochextrakte vorhandene Milchsäure durch Titration (unter Anwendung von Phenolphthalein als Indicator) ausreichend genau bestimmt werden, da andere sauere Produkte neben der Milchsäure praktisch nicht in Betracht kommen, diese letztere aber durchaus in freier Form vorhanden ist. Will man nun aber auch den im Eiweißkoagulum enthaltenen Milchsäureanteil der Bestimmung zugänglich machen, so muß man derart vorgehen, daß man das Koagulum durch Erwärmen mit Lauge verflüssigt, die albuminathaltige Lösung durch Zusatz gesättigter Kochsalzlösung enteiweißt und die Milchsäure nach dem von Fürth und Charnaß[2]) ausgearbeiteten Verfahren ermittelt.

Ich bin nun, einer Aufforderung Prof. v. Fürths folgend, an die Aufgabe herangetreten, festzustellen, ob die von anderen Autoren beobachtete Milchsäureabnahme bei fortschreitender Autolyse auch dann nachweisbar ist, wenn man einerseits jede Mitwirkung von Mikroorganismen mit Sicherheit vermieden hat und andererseits auch den beim Auskochen im Eiweißkoagulum verbliebenen Milchsäureanteil berücksichtigt. Konnte es doch nicht von vornherein ausgeschlossen werden, daß die Milchsäureabnahme bei der Autolyse nur eine scheinbare sei

---

[1]) Mondschein, Über die quantitative Bestimmung von Milchsäure bei Gegenwart von Eiweißkörpern. Diese Zeitschr. 42, 105, 1912.

[2]) Fürth und Charnaß, Über die quantitative Bestimmung der Milchsäure durch Ermittluug der daraus abspaltbaren Aldehydmenge. Diese Zeitschr. 26, 199.

und etwa durch eine vermehrte Milchsäurebindung an die Gewebseiweißkörper infolge autolytischer Veränderung verursacht werde.

Ich ging nun bei meinen Versuchen folgendermaßen vor: Verschiedene in möglichst frischem Zustande aus dem Schlachthause bezogene Organe des Pferdes (Herzmuskel, Leber, Milz und Niere) wurden mit Hilfe der Fleischhackmaschine fein zerkleinert. Von dem Organbrei wurden Portionen zu je 100 g abgewogen. In einer Portion jedes Organes wurde der Milchsäuregehalt im frischen Zustande bestimmt. Die anderen Portionen wurden in Glasdosen von einem halben Liter Fassungsraum, die mit einem eingeschliffenen Stöpsel versehen waren, in je 200 ccm physiologischer Kochsalzlösung suspendiert; dazu wurde in reichlichem Maße Chloroform und Toluol hinzugefügt. Nach kräftigem Durchschütteln wurden die Proben teils im Eisschranke, teils aber im Brutofen bei 40° aufbewahrt. Die letzteren Proben wurden täglich durchgeschüttelt; überdies wurde von Zeit zu Zeit neuerlich Chloroform hinzugefügt. In gewissen Zeitabständen wurde in den einzelnen Proben der Milchsäuregehalt bestimmt.

Ich ging dabei derart vor, daß ich den Inhalt des Gefäßes in eine emaillierte Blechschale übertrug und durch 10 Minuten langes Kochen koagulierte. Sodann wurde die Flüssigkeit durch ein Filter abgegossen, neuerlich Wasser hinzugefügt, wiederum aufgekocht und der Vorgang im ganzen dreimal wiederholt. In den vereinigten Filtraten wurde der Milchsäuregehalt durch Titration mit Phenolphthalein ermittelt. Um nunmehr auch die im Koagulum an Eiweiß gebundene Milchsäuremenge zu bestimmen, wurde, Mondscheins Vorgang entsprechend, das Koagulum durch Erwärmen mit 10%iger Natronlauge verflüssigt, das Eiweiß durch Zusatz gesättigter Kochsalzlösung und von Kochsalz in Substanz beseitigt und im Filtrate nunmehr die Milchsäure nach Fürth und Charnaß bestimmt. Zahlreiche Proben wurden vor der Verarbeitung durch Impfung auf Agar bakteriologisch geprüft. Dieselben erwiesen sich in allen Fällen als steril.

Ich lasse nunmehr meine Versuchsergebnisse in tabellarischer Form folgen.

1. Versuch.

Herzmuskel	Datum	Tag	Milchsäure	
			Brutschrank	Eisschrank
			Filtrat	Filtrat
100,0	2. V.	1	0,378	0,378
100,0	3.	2	0,396	0,378
100,0	4.	3	0,432	0,382
100,0	5.	4	0,450	0,387
100,0	6.	5	0,480	0,396
100,0	7.	6	0,513	0,405
100,0	9.	8	0,522	0,414
100,0	13.	12	0,540	0,432
100,0	18.	17	0,570	0,441
100,0	28.	27	0,630	0,459

2. Versuch.

Herzmuskel	Datum	Tag	Milchsäure					
			Brutschrank			Eisschrank		
			Filtrat	Koagul.	Gesamtmenge	Filtrat	Koagul.	Gesamtmenge
100,0	8. V.	1	0,54	0,15	0,69	0,54	0,15	0,69
100,0	15.	8	0,68	0,148	0,828	0,576	0,144	0,720
100,0	21.	14	0,72	0,146	0,866	0,594	0,147	0,741
100,0	10. VI.	34	0,81	0,143	0,953	0,603	0,147	0,75
100,0	25.	49	0,86	0,144	1,004	0,63	0,149	0,779
100,0	9. VII.	63	0,819	0,14	0,959	0,612	0,14	0,752

Aus den Versuchen 1 bis 5 ergibt sich folgendes:

Die Milchsäurebildung bei der Autolyse ist zweifellos ein Vorgang, der unabhängig von jeder Mitwirkung von Mikroorganismen vor sich geht.

Die sich in dem autolysierenden Organe vollziehende Milchsäureanhäufung schreitet langsam und kontinuierlich fort und erreicht unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen bei Brutofentemperatur ihr Maximum erst nach Ablauf von 4 bis 7 Wochen. Dasselbe entspricht in unserem Falle in der Leber einem Quantum von 1,476, in der Milz von 1,026, im Herzmuskel von 0,86, in der Niere von 0,675 für je 100 g Organbrei. (Fig. 1, S. 373.) Bei allen Versuchen von langer Dauer war im Brutschranke eine ausgesprochene Milchsäureabnahme wahrnehmbar. Dieselbe war nicht durch eine ver-

3. Versuch[1]). 4. Versuch[1]). 5. Versuch[1]).

Leber	Datum	Tag	3. Versuch Milchsäure Brutschrank Filtrat	Koagul.	Gesamtmenge	Eisschrank Filtrat	Koagul.	Gesamtmenge	Nieren	4. Versuch Milchsäure Brutschrank Filtrat	Koagul.	Gesamtmenge	Eisschrank Filtrat	Koagul.	Gesamtmenge	Milz	5. Versuch Milchsäure Brutschrank Filtrat	Eisschrank Filtrat
100,0	23. V.	1	0,45	0,114	0,56	0,45	0,14	0,59	100,0	0,27	0,146	0,416	0,27	0,146	0,416	100,0	0,271	0,271
100,0	27.	4	0,65	0,113	0,66	0,585	0,115	0,70	100,0	0,36	—	—	0,315	—	—	100,0	0,486	0,36
100,0	3. VI.	11	1,04	—	—	0,792	—	—	100,0	0,486	—	—	0,35	—	—	100,0	0,756	0,396
100,0	25.	33	1,476	—	—	0,81	—	—	100,0	0,675	0,141	0,816	0,396	0,145	0,541	100,0	1,026	0,414
100,0	10. VII.	45	1,215	0,11	1,325	0,792	0,11	0,902	100,0	0,495	0,15	0,645	0,396	0,148	0,544	100,0	0,765	0,432

[1]) Das Material der Versuche 3, 4 und 5 entstammt demselben Tiere.

mehrte Milchsäurebindung durch Eiweiß vorgetäuscht, tritt vielmehr auch bei Berücksichtigung dieser letzteren in Erscheinung. Die Milchsäurebindung durch die Organproteide erfolgte in sehr konstantem Ausmaße, derart, daß von je 100 g Organbrei 0,11 bis 0,15 Milchsäure derart gebunden wurden, daß diese Milchsäure beim Auskochen nicht in die Flüssigkeit überging, unabhängig von der Dauer des Versuches und unabhängig davon, ob die betreffende Probe sich im Eisschranke oder aber im Brutofen bei 40° befunden hatte. Dagegen erscheint die Gesamtmenge der bei der Autolyse entstehenden Milchsäure von der **Temperatur des Mediums** in hohem Grade abhängig, derart, daß bei höherer Temperatur erheblich größere Milchsäuremengen gebildet werden.

In Anbetracht der Konstanz des eiweißgebundenen Milchsäureanteiles gestattet die einfache **Titration des Kochextraktes** eines Organes immerhin eine Orientierung über den Verlauf der Milchsäurebildung.

Der Umstand, daß bei unseren Versuchen das Maxi-

mum der Milchsäurebildung im Organbrei erst in einem späteren Zeitpunkte in Erscheinung getreten ist, als dies bei Versuchen[1]) anderer Autoren der Fall war, dürfte in dem Umstande seine Erklärung finden, daß die bei der Milchsäure-

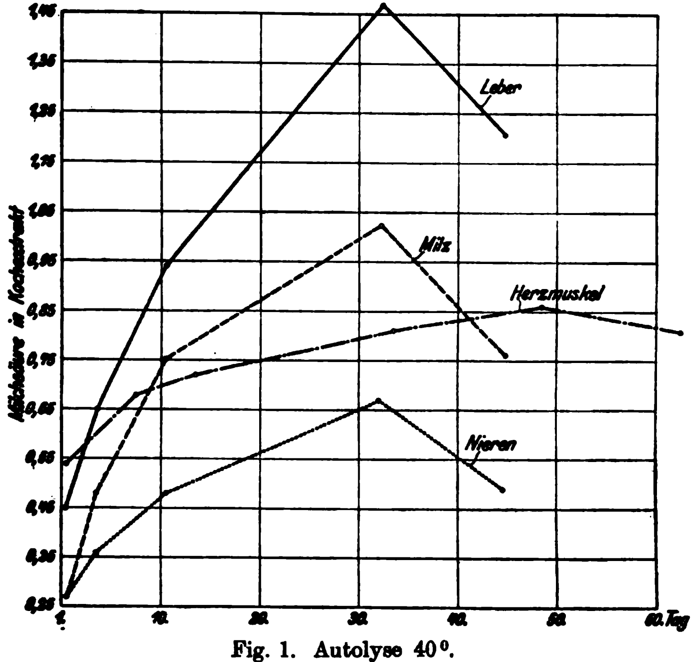


Fig. 1. Autolyse 40°.

bildung und -zerstörung offenbar mitwirkenden enzymatischen Vorgänge durch die im Überschuß vorhandenen Antiseptica eine Abschwächung erfahren haben.

---

[1]) R. Frew, Zeitschr. f. physiol. Chem. **60**, 15, 1909. — Inouye und Kondo, Zeitschr. f. physiol. Chem. **54**, 481. — T. Kikkoji, Zeitschr. f. physiol. Chem. **53**, 415, 1909. — R. Türkel. — G. Stein.

Die Abhängigkeit der Oxydasewirkung von Lipoiden.

Von

H. M. Vernon.

(Aus dem Physiologischen Laboratorium der Universität Oxford.)

(Eingegangen am 24. Oktober 1912.)

Mit 10 Figuren im Text.

In einer früheren Arbeit[1]) habe ich dargetan, daß die Oxydase der Nieren oder anderer Organe nach $^1/_2$ stündiger Behandlung mit Methyl-, Äthyl- oder Propylalkohol von geeigneter Stärke überhaupt nicht angegriffen wird. Dagegen kann eine verhältnismäßig geringe Erhöhung des Alkoholgehalts das Ferment zum größten Teil oder sogar vollständig zerstören. So wirkte z. B. eine 10 g-Mol 40 volumprozentigen Methylalkohol enthaltende Lösung auf die Oxydase nicht ein, während 14 m-Methylalkohol sie gänzlich vernichtete. In einem anderen Falle führte 4,8 m-Äthylalkohol keine Veränderung herbei, 8,0 m bewirkte eine Hemmung der Enzymtätigkeit. Zwischen diesen Werten liegende Konzentrationen zerstörten entsprechende Mengen Oxydase. Die auf die Oxydasen einwirkenden Alkoholkonzentrationen waren jedesmal ungefähr 20 mal so stark als die Konzentration, die bei Kaulquappen Narkose herbeiführt. Wahrscheinlich besteht ihre zerstörende Kraft in einem Angriff auf die für die Oxydasewirkung wesentlich in Betracht kommenden Lipoide. In der vorliegenden Arbeit möchte ich die Wirkung anderer lipoidlösender Körper auseinandersetzen, um für die Abhängigkeit der Oxydasewirkung von Lipoiden einen weiteren experimentellen Beweis zu erbringen.

---

[1]) Vernon, Journ. of Physiol. 45, 197, 1912.

Versuchsmethode.

Die untersuchte Oxydase war die Indophenoloxydase von Röhmann und Spitzer[1]), die die Oxydation einer Mischung von α-Naphthol und Paraphenylendiamin zu Indophenolblau herbeiführt. Die hier angewandte Methode, die schon an anderer Stelle[2]) ausführlich beschrieben ist, möchte ich hier nur kurz skizzieren. Eine abgewogene Menge des zerkleinerten Gewebes, im allgemeinen 0,5 g, wurde in einer Petrischale von 8,8 cm Durchmesser mit 5 ccm des Reagens gründlich durchmischt.

Letzteres enthielt $^1/_{150}$ m-α-Naphthol und Paraphenylendiamin und 0,17% ($^1/_{62}$ m-)Natriumcarbonat. Das Gemisch wurde eine geraume Zeit, meistens 1 Stunde lang, bei ca. 17° der Oxydation überlassen, die dann durch Zufügung von 10 ccm 97%igem Alkohol unterbrochen wurde. Dies bewirkte auch gleichzeitig Extraktion des Indophenols, das sich in unlöslicher Form auf dem Organextrakt angesammelt hatte. Nach $^1/_2$stündiger Extraktion wurde es abfiltriert und der Indophenolgehalt des Auszuges colorimetrisch durch Vergleich mit einer Testlösung bestimmt. Zur Herstellung dieser Standardfarblösung wurden 1,5 Teile des oben angegebenen Reagens mit 200 Teilen 50%igen Alkohols verdünnt und einige Tage aufbewahrt, bis die Lösung das Maximum an Farbe, durch vollständige Umwandlung in Indophenol, erreicht hatte. Da das Indophenol nicht sehr haltbar ist und nach ungefähr 14 Tagen allmählich verblaßt, so wurde jede Woche eine neue Normallösung hergestellt, in einer verschlossenen Teströhre aufbewahrt und nur so lange benutzt, als sie absolut einwandfrei erschien. Zum colorimetrischen Vergleich goß man eine gemessene Menge des Filtrats in eine andere Teströhre von genau demselben Durchmesser und verdünnte sie, bis sie die gleiche Farbenintensität wie die Testlösung zeigte. Die Farbe schwankt zwischen rötlichblau und violett. Durch geeignete Veränderung der Verdünnungsflüssigkeit erzielt man leicht dieselbe Schattierung, wie sie die Normallösung aufweist.

---

[1]) Röhmann und Spitzer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 28, 567, 1895.

[2]) Vernon, Journ. of Physiol. 42, 402, 1911 und 43, 96, 1911.

Bei Alkohol allein stellt sich ein reines Violett ein, bei Wasser allein ein rötliches Rosa, bei Mischungen dagegen von Alkohol und Wasser gewahrt man Zwischenfarben. Man verfuhr nun so, daß die Standardlösung und das verdünnte Filtrat über einem Blatt Papier, bei öfterer Vertauschung der Stellung, bezüglich der Farbe verglichen wurden. Diese Methode erwies sich überraschend genau, ja die Einstellung auf Farbengleichheit war zuverlässiger als bei Zuhilfenahme eines Colorimeters. Das Auge prüft eben leichter und exakter, wenn die zu vergleichenden Farbenflächen groß, d. h. 50×17 mm sind als in Form kleiner Kreise mit einigen Millimetern im Durchmesser.

Die Farbenvergleichung des verdünnten Filtrats mit der Normallösung wurde ungefähr $^1/_2$ Stunde nach Zusatz des $97\,^0/_0$igen Alkohols zu dem Organbrei vollzogen. Wenn diese Zeit nicht strickt innegehalten werden konnte, wurde der gefundene Wert entsprechend korrigiert. Die Korrektur betrug nur $+ 3\,^0/_0$, wenn die Extraktionszeit 20 Minuten, und $- 3\,^0/_0$ bei 50 Minuten oder meistens ganz minimale Werte, so daß sie nicht berücksichtigt zu werden brauchte.

In meinen schon veröffentlichten Arbeiten habe ich darauf hingewiesen, daß es unbedingt nötig ist, die oben angegebenen Versuchsbedingungen ziemlich genau zu beobachten, um mit dieser Indophenolmethode zuverlässige quantitative Resultate zu erhalten. Ist das Reagens mehr oder weniger verdünnt als gemäß unseren Angaben, so besteht kein direktes Verhältnis zwischen der gebildeten Indophenolmenge und der Einwirkungszeit. Weicht man von der Proportion zwischen Größe der Petrischalen und der Menge des verwendeten Reagens ab, so bedingt dies eine wesentliche Modifikation in der Bildungszeit des Indophonols. Nimmt man z. B. 20 ccm des Reagens anstatt der vorgeschriebenen 5 ccm, wodurch die Teilchen des zerkleinerten Gewebes vollständig mit Flüssigkeit durchtränkt werden, so geht die Indophenolbildung nur in 5 mal der Zeit vor sich. Die Erklärung hierfür ist die Tatsache, daß die Gewebe große Mengen reduzierender Substanzen enthalten, die andauernd die Oxydation des Spitzerschen Reagens hemmen. Die Indophenolbildung kann also nur dann schnell von statten gehen, wenn die Gewebeteilchen der Luft aus-

gesetzt und mit einer dünnen Schicht des Reagens umgeben sind.

Die Spitzersche Mischung oxydiert sich spontan zu Indophenol in mäßigem Tempo. Fast in allen meinen früher beschriebenen Versuchen habe ich die Menge dieser spontanen Oxydation bestimmt und sie von der gefundenen totalen abgezogen. Sind nur kleine Mengen Oxydase in den Geweben vorhanden, so ist die bewirkte Gesamtoxydation durch den Einfluß der reduzierenden Substanzen geringer als in der Kontrollösung. Folglich konnte man durch Auftreten von negativen Werten auf Gegenwart von Oxydase mit Sicherheit schließen. In den im folgenden aufgeführten Versuchen wurde kein Abzug für die spontane Oxydation des Reagens gemacht und daher gefunden, daß, wenn sogar jede Spur Oxydase durch das Narkoticum zerstört war, doch noch eine geringe Menge Indophenol gebildet wurde. Sie betrug nur 5 $^0/_0$ oder noch weniger, während das durch spontane Oxydation gebildete Quantum, bei Fehlen der reduzierenden Substanzen, gewöhnlich 16 $^0/_0$ erreicht.

Alle die zu beschreibenden Experimente wurden mit frisch entnommenen Kaninchennieren ausgeführt. Sie wurden sehr fein zerhackt, Portionen von je 0,5 g abgemessen, in kleine verschlossene Flaschen verteilt und mit 10 ccm Ringerscher Lösung, die das zu untersuchende Narkoticum enthielt, gut durchgeschüttelt. Nach $^1/_2$ stündiger Einwirkung wurde das Narkoticum aus den Geweben entfernt, indem man den Inhalt der Flaschen in Petrischalen mit Salzlösung auswusch und, nachdem sich die Gewebeteilchen zu Boden gesetzt hatten, die opalescierende Flüssigkeit mit einer Pipette abgesaugt. Dann wurden etwa 20 ccm frische Salzlösung zugefügt und nach 10 Minuten in gleicher Weise abpipettiert. Durch Schiefstellen der Petrischalen tropften die noch restierenden Spuren der Kochsalzlösung aus dem Gewebe ab. Nach $^1/_2$ Stunde Zusatz von 5 ccm des Reagens. Es wurden immer eine oder mehrere Kontrollproben angesetzt, in welchen der Nierenextrakt $^1/_2$ Stunde lang mit Kochsalzlösung ohne Narkoticum belassen wurde. Die erhaltenen Resultate berechneten wir als Prozentwerte des in diesem Kontrollversuch gebildeten Indophenols. Die wirkliche, so gefundene Menge schwankte in verschiedenen Fällen

zwischen 14 und 22 °/₀ des bei vollständiger Oxydation des Reagens produzierten Quantums, doch in 42 der 50 verschiedenen ausgeführten Bestimmungen lag der Wert zwischen 15 und 20 °/₀, oder er war ziemlich konstant.

Einwirkung von Ketonen.

Es wurde die Einwirkung von 5 verschiedenen Ketonen untersucht. Die erhaltenen Resultate bei 4 derselben sind in Fig. 1 zusammengestellt. In dieser Figur stellen die Ordinaten den Prozentwert des gebildeten Indophenols, bezogen auf die in der Kontrollprobe gefundene Menge, dar, die Abszissen die Konzentration des Ketons in g-Molekeln. In dieser und den folgenden Kurven sind die Werte in logarithmischen und nicht arithmetischen Reihen graphisch verzeichnet, so daß eine Verdoppelung oder Halbierung der Konzentration durch gleiche Entfernung an jedem Teile der Skala veranschaulicht wird.

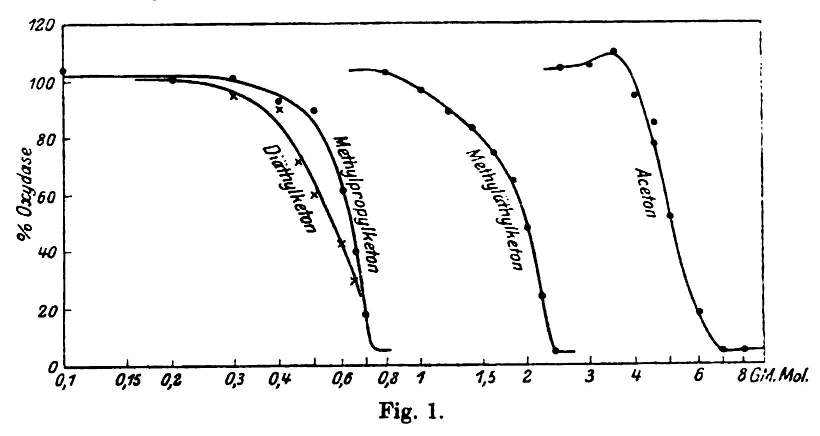


Fig. 1.

Wie hieraus ersichtlich, gibt Aceton, das Anfangsglied der Serie, die am schärfsten definierte Kurve (Fig. 1). Konzentrationen von 4 m (eine 23,2 °/₀ ige Lösung) oder weniger wirkten entweder auf die Oxydase gar nicht ein oder steigerten ihre oxydierende Kraft nur in geringem Grade, während 7 m-Aceton oder eine nur 1,75 mal so große Konzentration die Oxydase gänzlich vernichtete. Zwischenwerte bewirkten dementsprechende Effekte. Warum geringe Konzentrationen von Aceton das Oxydationsvermögen der Gewebe steigern, ist nicht zu ersehen, doch tritt dieses Phänomen nicht nur bei Aceton und bei zwei der anderen

geprüften Ketone auf, sondern bei fast allen der Narkotica, die zur Untersuchung gelangten. Vielleicht ist hier die Wirkung in physikalischen Momenten zu suchen, denn die mit narkotischer Lösung extrahierte zerhackte Niere schien sich mit dem Reagens besser zu vermischen als das unausgezogene Gewebe, dessen Teilchen eher eine Tendenz zum Aneinanderhaften und Schwimmen an der Oberfläche zeigten.

Methyl-Äthylketon lieferte ein nicht ganz so scharfes, eindeutiges Resultat. Erst wurde die Oxydase durch die 0,9 m-Lösung in ihrer Aktivität gehemmt, doch vollkommen aufheben konnte sie erst eine Lösung mit 2,4 m, d. h. eine 2,7 mal so große. Methylpropylketon und Diäthylketon gaben fast parallele Kurven, wie man auch von vornherein erwarten durfte. Wahrscheinlich ist die wirkliche Übereinstimmung größer, als die experimentellen Ergebnisse zur Anschauung bringen, da diese Ketone nur sehr schwer absolut frei von Verunreinigungen zu erhalten sind. So enthielt z. B. das Methyl-Äthylketon zweifellos eine Spur einer etwas löslichen, verunreinigenden Substanz, die sich in einer fast gesättigten Lösung des Narkoticums nicht löste. Vor Verwendung der Lösung bei den in der Kurve verzeichneten Versuchen wurde diese Spur entfernt. Geschah dies nicht, so erwies sich die Lösung der Oxydase gegenüber wesentlich schädlicher: eine 1,4 m-Lösung zerstörte 48% der Oxydase, anstatt der sonst zu erwartenden 17%.

Das Diäthylketon war in Kochsalzlösung nicht genügend löslich, um eine die Oxydase gänzlich hemmende Mischung zu liefern. Das andere untersuchte Keton, Methyl-Phenylketon, oder Hypnon löste sich so wenig, daß eine gesättigte Lösung nur 20% der Oxydasewirkung lähmte. Die hier auf Grund von Versuchen erzielten Ergebnisse geben wir in Fig. 2, zusammen mit denjenigen der zwei anderen geprüften aromatischen Körper, Phenol und Orthokresol, wieder. Bei Phenol ergab sich ein scharf präzisiertes Resultat (Fig. 2); die Oxydase sehen wir erst in ihrer Wirkung durch die 0,067 m-Lösung gehemmt und praktisch durch 0,12 m oder eine 1,8 mal so große Konzentration vernichtet. Geringer Gehalt an Phenol wie auch an Orthokresol vergrößerten die Oxydationskraft der Gewebe um ca. 10%.

Die fermentschädliche Wirkung dieser Narkotica wird vielleicht am besten klar, wenn man die zur Zerstörung von

50 % der Oxydasenaktivität nötige Konzentration bestimmt; diese Werte sind in der zweiten Kolonne der untenstehenden Tabelle aufgeführt. Auch die in meinen schon veröffentlichten Abhandlungen für die aliphatischen Alkohole angegebenen Zahlen sind in die Aufstellung mit einbezogen worden. In der nächsten Spalte stehen die Quotienten von aufeinanderfolgenden Kon-

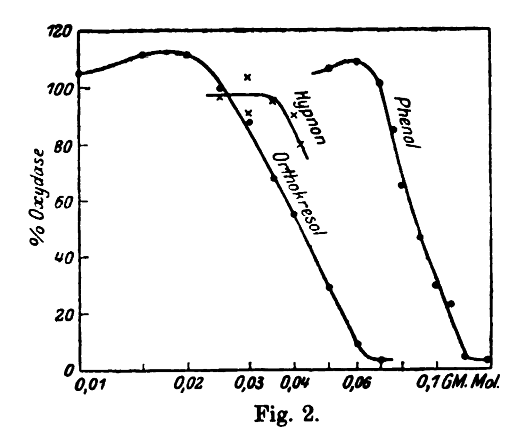


Fig. 2.

zentrationen von Ketonen und Alkoholen, zwischen 2,1 und 3,5 schwankend, im Durchschnitt 2,8. Führer und Neubauer[1]) erhielten einen Durchschnittsquotienten von 3,0 für die Konzentration der einwertigen aliphatischen Alkohole, die die roten Blutkörperchen lackfarben machen, während Führer[2]) Quotienten von 3,0 bis 4,5 für die Einwirkung dieser Alkohole auf verschiedene Organismen angibt.

Narkoticum	50 % Oxydase zerstörende Konzentration	Quotient	Narkot. Konzentration	Verhältnis
Aceton	m-5,1	2,6	m-0,26	20
Methyläthylketon .	2,0	3,2	0,09	22
Methylpropylketon	0,63	3,5	0,019	33
Diäthylketon . . .	0,57		0,029	20
Phenol	0,088	2,1	0,0053	17
o-Kresol	0,042		0,0012	35
Methylalkohol . .	12,6	2,1	0,57	22
Äthylalkohol . . .	5,9	2,8	0,29	20
Propylalkohol . .	2,14	3,2	0,11	19
Butylalkohol . . .	0,66		0,038	17

[1]) Führer und Neubauer, Centralbl. f. Physiol. **20**, 117, 1907.
[2]) Führer, Zeitschr. f. Biol. **57**, 465, 1912.

In der nächsten Spalte finden sich die Werte der narkotisierenden Konzentrationen, wie sie Overton[1]) für Kaulquappen ermittelt hat, und in der letzten das Verhältnis zwischen den Oxydasewerten und den zur Narkose nötigen Konzentrationen. Wie aus der Tabelle hervorgeht, schwankte dieses Verhältnis für drei der vier aufgezeichneten Ketone nur zwischen 20 und 22. Der für Methylpropylketon erhaltene Wert kann aus dem schon oben erörterten Grunde bis zum gewissen Grade unrichtig sein. Für Methylphenylketon ist es nicht möglich, ein Verhältnis mit einiger Genauigkeit festzustellen. Wenn die in Fig. 2 gegebene Kurve mit der o-Kresolkurve parallel läuft, so müßte eine 0,056 m-Lösung zur Zerstörung von 50 % der Oxydase notwendig sein. Nach Overtons Angabe ist die narkotisierende Konzentration des Hypnons 0,00083 m resp 0,00104 m, so daß wir ein Verhältnis zwischen 54 und 67 erhalten, also ein viel höheres als das bei den anderen Ketonen oder bei Phenol und o-Kresol beobachtete. Diese beiden aromatischen Alkohole weisen sehr weit auseinander liegende Werte auf, was wohl zum Teil darin seinen Grund hat, daß Overton ihre narkotisierende Konzentration, die auf Genauigkeit Anspruch hätte, nur schwer fixieren konnte. Wie wir schon gesehen haben, sind die Oxydasekurven ganz eindeutig, und die 50 %ige Oxydase liefert den Quotienten 2,1. Dies ist ein viel wahrscheinlicherer Wert als der durch die narkotisierende Konzentration erhaltene von 4,4.

Die Alkoholwerte bewegen sich zwischen 17 und 22 oder stimmen mit den Ketonzahlen überein, so daß wir den Satz aufstellen können, daß in der Regel zur Zerstörung von 50 % der Nierenoxydase ungefähr das zwanzigfache der narkotisierenden Konzentrationen von Alkoholen und Ketonen erforderlich ist.

Einwirkung von Estern.

Von den untersuchten Estern lieferten die Urethane die eindeutigsten Resultate. Ein Blick auf die Kurve in Fig. 3 belehrt, daß Äthylurethan erst bei einer Konzentration von 1,1 m schädlich auf die Oxydase einzuwirken begann und sie bei einem Gehalt von 2,4 m gänzlich zerstörte. Bei Methyl- und Propylurethanen entstehen Kurven mit fast ebenso scharfen

[1]) Overton, Studien über die Narkose. 1901.

Profilen, nur haben ganz geringe Konzentrationen von Methylurethan aus noch unbekanntem Grunde eine gewisse Menge Oxydase vernichtet. Es wurden mit zwei Proben des Narkoticums Bestimmungen vorgenommen, wobei sich herausstellte, daß Lösungen von 1,4 m, 1,5 m, 1,6 m und 2,0 m ausnahmslos 11 bis 16 % der Oxydase abtöteten. Die 0,7 m-Lösung von Propylurethan war übersättigt. Zur Auflösung aller Krystalle mußte sie gelinde erwärmt werden; einige setzten sich wieder während der halbstündigen Einwirkungszeit auf den Nierenextrakt ab.

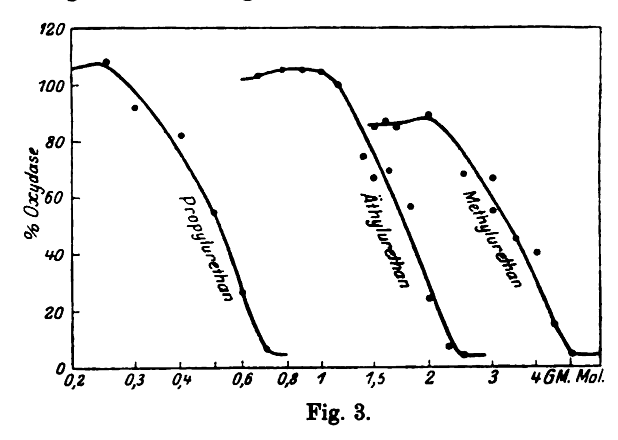


Fig. 3.

Auch Phenylurethan ist in den Kreis der Untersuchungen gezogen worden. Eine 0,01 m-Lösung, die nach mehrstündigem Stehen Krystalle bildete und demnach übersättigt war, zerstörte nur 7 % der Oxydase, während noch verdünntere Lösungen überhaupt keine Wirkung auf das Ferment ausübten. Somit erübrigten sich weitere Versuche mit diesem Ester.

Die Ester der Fettsäuren lieferten keine solchen prägnanten Resultate wie die Urethane. Aus der Kurve in Fig. 4 ersieht man, daß Äthylpropionat anfangs einen schädigenden Effekt — in Konzentrationen von 0,08 m — der Oxydase gegenüber hatte. Eine gesättigte Esterlösung, 0,2 m enthaltend, vernichtete 85 % der Oxydase. Bei Vervollständigung der Kurve würde sich wohl ergeben, daß eine Konzentration von 0,23 m, also eine 2,9 mal größere als die erste auf die Oxydase einwirkende das Ferment völlig inert gemacht haben würde. Der Einwirkungsbereich von Propylacetat und Äthylformiat war nur um ein geringes größer als derjenige von Äthylpropionat. Eine

gesättigte Lösung von Äthylbutyrat zerstörte nur 40 % Oxydase, doch die bei dieser, wie bei niedrigeren Konzentrationen, ermittelten Zahlen scheinen darauf hinzudeuten, daß die zugehörige Kurve in ihrer Gestalt denen der anderen Ester analog ist.

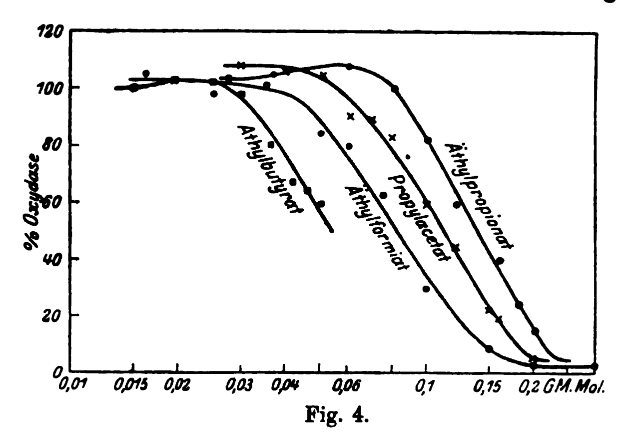


Fig. 4.

Die bei Äthylacetat gewonnenen Resultate waren in hohem Grade unstimmig. Die an einem Tage bei derselben Nierenextraktprobe erhaltenen Werte stimmten zwar gut überein, doch wichen sie von denjenigen, die an einem anderen Tage

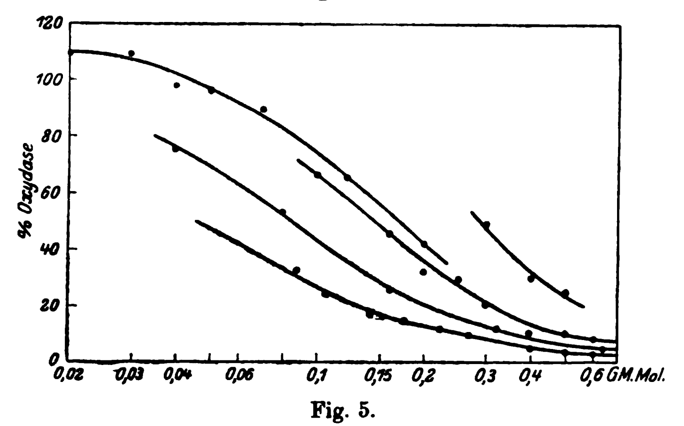


Fig. 5.

bei einer anderen Probe gefunden wurden, in der Regel weitgehends ab. Fünf Reihen von Werten, von denen jede auf Grund einer verschiedenen Nierenprobe ermittelt war, sind in Fig. 5 zusammengestellt. Man sieht, daß 50 % Oxydase durch 0,29 m, 0,17 m, 0,14 m, 0,085 m und 0,045 m Äthylacetat vernichtet

wurden, oder durch Mengen, die zwischen 1 und 6,4 schwankten. Die Erklärung hierfür liefert wohl die Tatsache, daß die zerkleinerten Gewebe eine Lipase enthalten, die diese Ester mit ziemlicher Schnelligkeit hydrolysiert. Wie später noch gezeigt werden wird, übt freie Essigsäure eine viel schädlichere Wirkung auf Oxydase aus als Äthylacetat. Höchstwahrscheinlich beruht ein unbekannter Bruchteil der in diesen Versuchen beobachteten Oxydasevernichtung auf dem Einwirken der durch die Lipase in Freiheit gesetzten Essigsäure. Da die Menge der in den Geweben vorhandenen Lipase in bedeutendem Umfange eine schwankende Größe ist, so ist infolgedessen die Menge der freien Säure dementsprechend eine wechselnde. So fand Sieber[1]) z. B., daß fünf verschiedene Proben von menschlichem Lungenextrakt unter denselben Bedingungen 47, 37, 32, 25 und 19 Einheiten Äthylbutyrat spalteten.

Man könnte erwarten, daß die wechselnden, bei Äthylacetat gefundenen Werte bei den anderen untersuchten Estern noch anschaulicher in Erscheinung treten würden. So geben Kastle und Lövenhart[2]) an, daß Pankreaslipase Äthylbutyrat schneller als Äthylpropionat spaltet und letzteres schneller als das Acetat. Diese Erwartung bestätigt sich aber nicht, wahrscheinlich weil die benutzten Konzentrationen gewöhnlich niedriger als die von Äthylacetat sind und die in Freiheit gesetzten Säuren an Wirkung der Essigsäure nachstehen. Die meisten in Fig. 4 verzeichneten, für jeden Ester gültigen Werte wurden an nicht mehr als zwei verschiedenen Extraktproben gewonnen und stimmten zufällig ziemlich gut überein. Einige Einzelbestimmungen, die an anderen Proben ausgeführt wurden, sind der Übersichtlichkeit wegen in der Figur nicht aufgeführt. So lieferten z. B. zwei mit 0,07 m und 0,10 m Propylacetat vorgenommene Versuche 77 resp. 51%ige Oxydasewerte gegenüber 89 und 59%, die wir in der Figur verzeichnet sehen. Ein Versuch, der mit einer 0,1 m Äthylpropionatlösung angestellt wurde, lieferte den Oxydasewert von 40% — die Figur weist dagegen 82% auf. Die Äthylformiatzahlen, obgleich aus Versuchen an 3 verschiedenen Nierenproben resultierend, sind alle untereinander gleichlautend.

---

[1]) N. Sieber, Zeitschr. f. physiol. Chem. 55, 177, 1908.

[2]) Kastle und Lövenhart, Amer. Chem. Journ. 24, 491, 1900.

Bei anderen Narkoticis außerhalb dieser Fettsäureester treten solche Unregelmäßigkeiten in den Resultaten nicht auf. In jedem Falle wurden wenigstens 2 verschiedene Nierenproben zur Untersuchung herangezogen, meistens sogar 3 oder 4, und stets fanden wir eine sehr befriedigende Übereinstimmung der Werte. So gewannen wir die für Methylurethan experimentell gefundenen und angegebenen Werte an 6 verschiedenen Nierenextraktproben, diejenigen für Äthylurethan an 5.

Die 50 °/₀ Oxydase zerstörenden Esterkonzentrationen liefern Quotienten, die in den meisten Fällen mit denen für Ketone und Alkohole beobachteten übereinstimmen. Der Quotient 2,6 zwischen Äthylbutyrat und Äthylpropionat ist ein ganz normaler.

Narkoticum	50 °/₀ Oxydase zerstörende Konzentration	Quotient	Narkot. Konzentration	Verhältnis
Methylurethan	m-3,4	2,0	m-0,27	13
Äthylurethan	1,73	3,3	0,041	42
Propylurethan	0,52		—	—
Äthylformiat	0,082	(1,8)	0,07	1,2
Äthylacetat	0,29—0,045	(2,5)	0,03	(10)
Propylacetat	0,114	(2,1)	0,0105	11
Äthylpropionat	0,139	2,6	0,0105	13
Äthylbutyrat	0,054		0,0043	13

Doch nur bei den höchsten auftretenden Konzentrationen des Äthylacetats erhält man so normale Quotienten wie diejenigen zwischen diesem Ester und Äthylpropionat oder Propylacetat. Wahrscheinlich ist dieser hohe Konzentrationsgrad der zuverlässigste unter den beobachteten Werten, d. h. er ist dem Angriff der durch die Lipase freigemachten Essigsäure am wenigsten unterlegen. Jedoch ist das Verhältnis zwischen Äthylformiat und Äthylacetat ein gänzlich anormales, wählt man nicht die niedrigste, 50 °/₀ der Oxydase zerstörende Konzentration des Acetats. Die Äthylformiatzahlen sind zweifellos ungewöhnlich niedrig, was man wohl dem Umstande zuschreiben muß, daß dieser Ester außerordentlich leicht, ja schon durch reines Wasser hydrolysiert wird. Auch Kastle und Lövenhart fanden, daß Pankreaslipase ihn schneller als Äthylacetat spaltet.

Die von Overton erzielten, Narkose hervorrufenden Werte der Fettsäureester weisen im Gegensatz zu den Nieren-

oxydaseergebnissen ganz reguläre Quotienten, 2,3 bis 2,9, auf. Andererseits ist das Verhalten der Urethane insofern abnorm, als der Quotient zwischen Äthyl- und Methylurethan 6,6 beträgt. So bekommen wir kein konstantes Verhältnis zwischen Oxydasewert und narkotisierendem Grenzwert, wie es bei den Ketonen und Alkoholen der Fall war. Da Overton keine Bestimmung über den narkotischen Effekt des Propylurethans ausgeführt hat, ist ein Vergleich hier nicht möglich.

Die Verhältniszahlen zwischen Oxydase- und narkotisierendem Schwellenwert schwanken für Propylacetat, Äthylpropionat und Äthylbutyrat zwischen 11 und 13. Für Äthylacetat weicht das Verhältnis nicht um viel ab, wenn mit der höchsten Oxydasekonzentration gerechnet wird. Bei Methylurethan betrug es 13, so daß gegen den Durchschnittswert 20 für Ketone und Alkohole die Ester in der Regel nur den Wert 12 aufweisen.

Die Einwirkung von Chloroform und Äther.

Die Wirkung von Chloroform auf die Oxydase ist schwerer als die der meisten anderen Narkotica zu ermessen, weil es sehr flüchtig und in Salzlösung nur wenig löslich ist. Bei den Versuchen wurden 0,5 g Proben zerhackter Niere in Stöpselflaschen von 30 ccm Inhalt mit den notwendigen Mengen Ringerscher Lösung versetzt, dann wurde eine fast gesättigte Chloroformsalzlösung unter die Normalsalzlösung gegossen, um das Gesamtvolumen der benötigten Konzentration auf 20 ccm zu bringen. Die Flaschen wurden in kurzen Zwischenräumen geschüttelt, um die Herstellung des Gleichgewichts zwischen dem Chloroform in den Gewebsteilchen und in der Salzlösung zu beschleunigen. Auch in den Versuchen mit den anderen Narkoticis sind die Flaschen oft geschüttelt worden, worauf wir nicht speziell verwiesen haben, wenn auch nicht so häufig wie bei Chloroform.

Die Konzentrationen der in den Versuchen gefundenen Werte sind aus äußeren Gründen in Fig. 6 mit 10 multipliziert worden. Die durch sie bestimmte Kurve weicht in der Gestalt etwas von den anderen Narkoticakurven insofern ab, als sie eine nur sehr allmählich ansteigende, zerstörende Wirkung auf die Oxydase veranschaulicht. Eine mit Chloroform gesättigte Salzlösung löste 0,068 m-Chloroform auf und zerstörte 60% Oxy-

dase. Eine nur wenig übersättigte Lösung, die Chloroform in Suspension enthielt, vernichtete die gesamte Oxydase.

Die Gestalt der Ätherkurve ist ganz typisch und markiert das scharfe Einsetzen der hemmenden Wirkung auf das Ferment. Sogar gesättigte Ätherlösungen zerstörten es nur zur Hälfte.

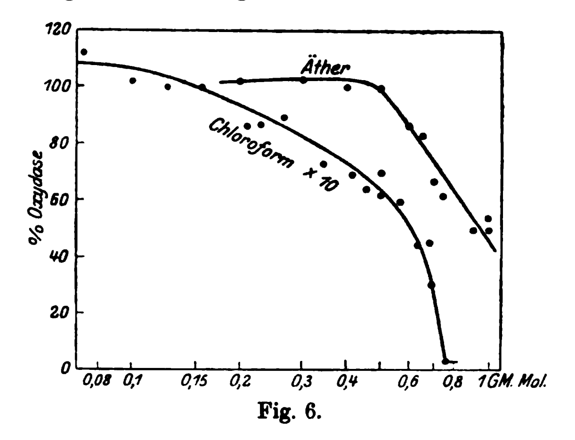


Fig. 6.

Für Chloroform beträgt der die Oxydase bis auf 50 % zerstörende Wert 0,06 m, für Äther 0,95 m; die entsprechenden, narkotisierenden Overtons lauten 0,0012 m und 0,07 m, wir erhalten also die Verhältniszahl 50 für Chloroform und 14 für Äther. Die Ursache, warum der Chloroformwert so abnorm ausfällt, ist nicht aufgeklärt, doch wenn man diejenigen Konzentrationen der Narkotica in Betracht zieht, die die Anfangsschädigung der Oxydase herbeiführen, und nicht die bis auf 50 % zerstörenden Werte, so erscheint die Abweichung nicht mehr ganz so unverständlich. Diese Konzentrationen betragen für Chloroform 0,0145 m und 0,5 m für Äther oder sind 12 resp. 7 mal so groß wie die entsprechenden Narkosewerte.

Einwirkung von Aldehyden.

Die Aldehyde der Fettsäurenreihe sind nicht echte Narkotica, während Paraldehyd $(C_2H_4O)_3$, ein typisches Narkoticum, in Wirklichkeit gar kein Aldehyd ist. Diese Substanzen haben eine spezifische, ihnen eigentümliche Wirkungsweise auf die Oxydase, die eine große Stütze für die Annahme gewährt, daß die Oxydasenlähmung eines echten Narkoticums von seinem Einfluß auf gewisse wesentliche Lipoidmembranen abhängt.

Aus den Kurven in Fig. 7 geht hervor, daß Formaldehyd einen höchst ausgedehnten Wirkungsbereich auf Nierenoxydase

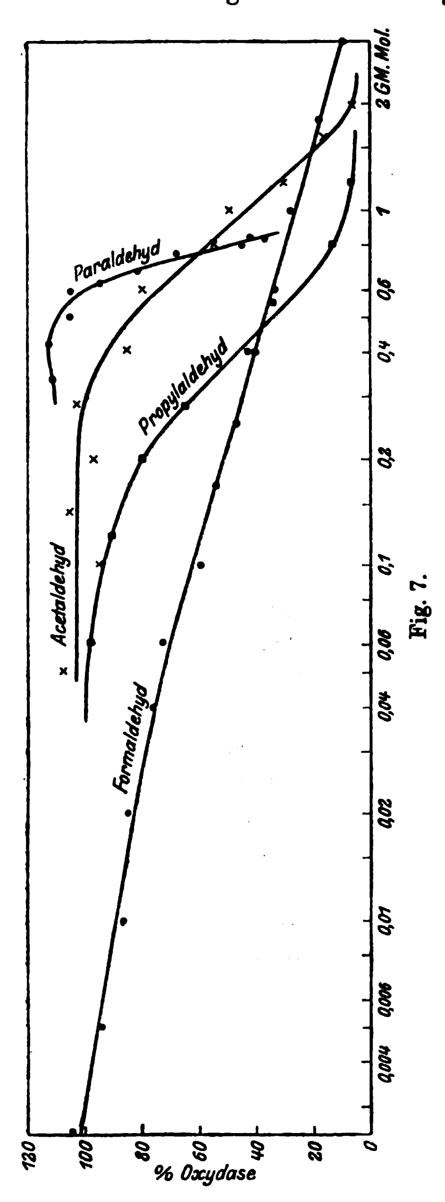


Fig. 7.

besitzt. Der Effekt setzt bei einer 0,003 m-Konzentration ein und erreicht erst sein Maximum — d. h. die völlige Zerstörung des Enzyms — bei einer 4 m-Lösung oder einer 1330 mal so großen Konzentration. Auch Propylaldehyd, obgleich dem Formaldehyd in seiner Wirkungsstärke weit nachstehend, weist einen bedeutenden Umfang auf. Eine 0,04 m-Konzentration bewirkt den ersten schädlichen Einfluß und eine solche von 1,6 m oder 40 mal so hohe die völlige Zerstörung der Oxydase. Bei Acetaldehyd tritt die erste zu verzeichnende Schädigung bei einem Gehalt von 0,3 m auf, die gänzliche bei einer 8 mal so großen = 2,4 m. Das Narkoticum par excellence aber, Paraldehyd, ist in seinem Wirkungsbereich ebenso scharf umgrenzt wie fast irgend eines der früher untersuchten Narkotica. Einsetzen der Hemmung findet bei 0,6 m statt, und aus der Kurvenform läßt sich ermitteln, daß die maximale bei einer 1,1 m oder 1,8 mal so großen zustande kommen würde. Eine ge-

sättigte Paraldehydlösung enthält nur 0,83 m des Narkoticums, doch die Kurve ist so eindeutig in ihrem Verlauf, daß man ohne Schwierigkeit den theoretisch zu berechnenden Punkt der vollständigen Oxydasezerstörung mit einiger Genauigkeit bestimmen kann.

Der 50%ige Oxydasewert das Paraldehyds liegt bei 0,8 m, während der von Overton ermittelte narkotisierende Grenzwert 0,025 m beträgt, so daß das Verhältnis 32 zwischen beiden sich ergibt. Für die anderen Aldehyde ist ein analoger Vergleich unmöglich, weil sie, wie schon oben erwähnt, nicht als Narkotica wirken.

Einwirkung von Säuren und Alkalien.

Wahrscheinlich stehen die Aldehyde in bezug auf ihren weitausgedehnten Wirkungsumfang nicht vereinzelt da, dasselbe wird für die meisten Gifte außer den lipoidlöslichen zutreffen, sicherlich für die Säuren und Alkalien, wie die Kurven von Fig. 8 lehren. So entfaltete Essigsäure seine erste schädliche

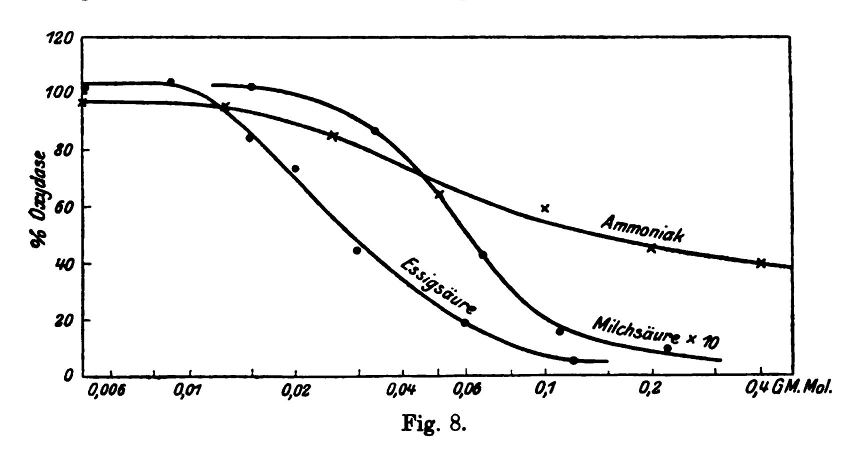


Fig. 8.

Wirkung auf die Oxydase bei einer 0,011 m-Konzentration und führte völlige Lähmung des Fermentes bei 0,13 m oder 12 mal so starken herbei. Für Milchsäure sind die Grenzwerte 0,0019 m und 0,032 m, sie verhalten sich also wie 1 : 17. Den größten Wirkungsbereich von allen weist Ammoniak auf: eine 0,005 m-Lösung zerstört 3% Oxydase, eine von 0,41 m nur 61%. Aus der Gestalt der Kurve läßt sich vermuten, daß die Grenzwerte

dieses Alkalis sogar noch weiter auseinander liegen als die für Formaldehyd gefundenen.

Die 50 % der Oxydase zerstörende Konzentration von Essigsäure beträgt 0,029 m, während die entsprechende für Äthylacetat zwischen 0,085 m und 0,29 m schwankte. Daher würde Spaltung eines verhältnismäßig geringen Bruchteils des Esters durch die intracelluläre Lipase genügen, um die unerwartet große Menge der in den Esterversuchen zerstörten Oxydase zu erklären. Ein wirklicher Beweis für das Zustandekommen einer solchen Hydrolyse konnte indirekt erbracht werden. In all den bisher beschriebenen Versuchen ließ man das Narkoticum 30 Minuten lang auf den Nierenextrakt einwirken, doch erreicht die Oxydasezerstörung ihren Grenzwert noch nicht in dieser Zeit. Wie aus den in Fig. 9 verzeichneten Angaben erhellt, wobei die Einwirkungsdauer sich zwischen 10 und 120 Minuten erstreckt, ist der Effekt der Narkotica anfangs ein rapider und

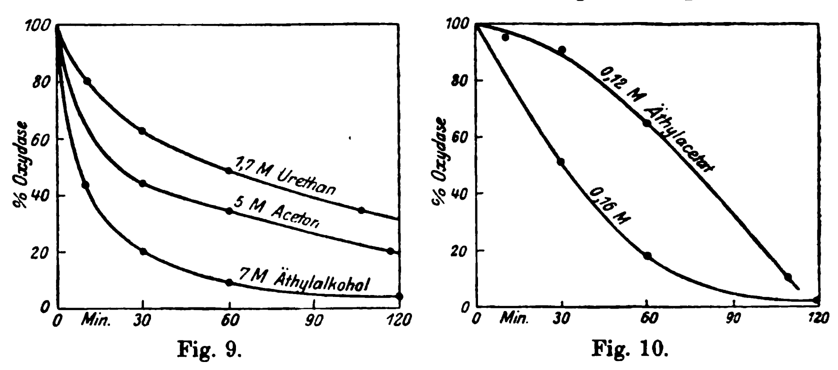


Fig. 9. Fig. 10.

wird dann immer langsamer. Wir können jedoch aus der Form der Kurven den Schluß ziehen, daß ihre Wirkung in gewissem Grade noch nach 2 Stunden fortdauern würde. In Fig. 10 sind die bei Äthylacetat ermittelten Resultate graphisch dargestellt und weichen, wie ein Blick darauf überzeugt, beträchtlich von den bei den anderen Narkoticis erzielten ab. In den mit 0,12 m-Äthylacetat angestellten Versuchen war nur geringe Oxydasehemmung in der ersten halben Stunde bemerkbar, ging dann wesentlich schneller vor sich, was vermutlich auf der Freimachung von freier Säure beruht. Bei 0,16 m-Acetat wurden 48 % der Oxydase in der ersten halben Stunde zerstört und 34 % in der zweiten. Diese 34 % stellen 65 % der ge-

samten, nach der ersten halben Stunde unzerstört gebliebenen Oxydase dar, oder das Tempo der lähmenden Wirkung müßte bedeutend schneller als im Anfang gewesen sein. Nach 117 Minuten, und vermutlich schon früher, war die Oxydase völlig vernichtet.

Allgemeine Schlüsse.

Die Konzentrationen, bei denen einige der untersuchten Narkotica den Anfangs- und Endpunkt ihrer schädlichen Wirkung auf Nierenoxydase zeigen, sind gelegentlich angegeben worden. Zwecks eines vollständigen Vergleichs aber sind die Werte der ganzen Reihe in der nachstehenden Tabelle zusammengestellt.

	Anfang der schädlichen Wirkung der Oxydase	Zerstörung der Oxydase	Wirkungsumfang
Methyalkohol	m-10,5	m-14,0	1—1,33
Äthylalkohol	4,8	8,0	1,67
Propylalkohol	1,5	2,75	1,83
Butylalkohol	0,32	0,9	2,8
Heptylalkohol	0,0065	0,065	10
Phenol	0,067	0,12	1,8
o-Kresol	0,026	0,063	2,4
Aceton	4,0	7,0	1,75
Methyläthylketon	0,9	2,4	2,7
Methylpropylketon	0,32	0,74	2,3
Diäthylketon	0,24	0,74	3,1
Methylurethan	(2,0)	5,0	2,5
Äthylurethan	1,1	2,4	2,2
Propylurethan	0,29	0,72	2,5
Äthylformiat	0,035	0,168	4,8
Propylacetat	0,055	0,21	3,8
Äthylpropionat	0,08	0,23	2,9
Äther	0,5	1,7?	3,4?
Chloroform	0,0145	0,075	5,2
Paraldehyd	0,6	1,1	1,8
Formaldehyd	0,003	4,0	1330
Acetaldehyd	0,3	2,4	8
Propylaldehyd	0,04	1,6	40
Essigsäure	0,011	0,13	12
Milchsäure	0,0019	0,032	17
Ammoniak	0,003?	10?	3300?

Die aus meiner früheren Arbeit ermittelten Werte für einwertige Alkohole stehen voran, denn sie lassen erkennen, daß der Wirkungsumfang eines Narkoticums mit seinem Molekulargewicht in nächster Beziehung steht. So fanden wir von

allen Narkotica für Methylalkohol den am engsten begrenzten und darauf folgend den für Äthylalkohol. Bei Propylalkohol erstreckte er sich weiter als bei Äthylalkohol, bei Butylalkohol in noch größerem Maße. Die in der Reihe folgenden Alkohole hatten vermutlich noch einen ausgedehnteren Bereich, denn bei Heptylalkohol, $C_7H_{16}O$, verhielten sich die Grenzwerte wie 1 : 10. Die anderen geprüften homologen Reihen zeigten mit ansteigendem Molekulargewicht keine große Veränderung in bezug auf Ausdehnung ihrer Wirkungsmöglichkeit. o-Kresol hatte eine größere als Phenol und die höheren Glieder der Ketonreihe eine ausgesprochen größere als Aceton, doch wies Methyläthylketon, vielleicht auf Grund vorhandener Verunreinigungen ein größeres Bereich als Methylpropylketon auf. Die drei Urethane hatten jedoch praktisch dasselbe Wirkungsgebiet, wenn man als den richtigen Anfangseffekt von Methylurethan bei einer 2 mol. Konzentration den Punkt, wo die Kurve jäh absinkt, betrachtet. Die Fettsäureester weisen, soweit sie zur Untersuchung gelangten, einen dem zunehmenden Molekulargewicht indirekt proportionalen und sich verringernden Bereich auf. Der Umstand, daß die drei Narkotica mit den höchsten Konzentrationswerten, nämlich Methyl-, Äthylalkohol und Aceton, die niedrigsten Verhältnisse, während umgekehrt die zwei mit den niedrigsten — Chloroform und Heptylalkohol — die höchsten Verhältniszahlen zeigen, scheint darauf hinzudeuten, daß das Verhältnis in direkter Beziehung zum Molekulargewichte steht, ganz unabhängig davon, ob die Narkotica Glieder homologer Reihen sind. Die Zwischenwerte lassen sich jedoch nicht mit dieser Behauptung in Einklang bringen. Wenn man von dem unzuverlässigen Fettsäurewert absieht und den Rest in zwei Gruppen teilt, so findet man auf der einen Seite solche Narkotica, die in Konzentrationen zwischen 2 m und 0,5 m wirken und ein Durchschnittsverhältnis 2,4 aufweisen, auf der anderen solche mit Konzentrationen zwischen 0,32 m und 0,026 m, mit dem Verhältnis 2,5.

Betrachten wir die Narkotica im ganzen, so sehen wir bei 14 von den 20 untersuchten die Verhältniszahl 2,9 oder eine kleinere, und daß in der großen Mehrzahl der Fälle die Narkotica bis zu einer gewissen Konzentration entweder gar keine Wirkung auf die Nierenoxydase ausübten oder ihre Oxyda-

tionskraft um ein geringes erhöhten. Dann kommt plötzlich der Augenblick des schädigenden Effekts, der sich fortan steigert, bis die Konzentration das Doppelte oder Dreifache der anfänglichen erreicht und die Oxydase völlig vernichtet ist. Wie ich bereits in meiner früheren Arbeit dargetan habe, sind die Konzentrationen von Äthyl-, Propyl- und Butylalkohol, die den beginnenden hemmenden Einfluß auf die Nieren-, Herz- oder Gehirnoxydase zeigen, um weniges höher als die von Neubauer und Fühner gefundenen Mengen, die Lackfärbung der roten Blutkörperchen hervorrufen. Mit diesen letzteren fast identisch sind aber die schädlichen Konzentrationen in bezug auf die Leberoxydase. Folglich lag die Vermutung nahe, daß die Einwirkung der Alkohole in der Auflösung einer bestimmten wesentlichen Lipoidmembran besteht. Vielleicht ist es eine Membran, die die Oxygenase- und Peroxydaseenzyme der Gewebe zusammenhält und ihr gemeinsames Wirken ermöglicht. Die vorliegenden Resultate bestätigen diese Hypothese insofern, als bei anderen Narkoticis dasselbe Verhalten wie bei den Alkoholen nachgewiesen werden konnte.

Diese Abhängigkeit der Oxydasen von Lipoiden unterscheidet sie von den meisten, wenn nicht allen anderen Enzymen. Denn wie allgemein bekannt ist, wirken die gewöhnlichen proteolytischen, amylolytischen und lipolytischen Enzyme in mit lipoidlöslichen Antisepticis gesättigten Lösungen, wie z. B. Chloroform, Toluol und Thymol durchaus normal. Eine Ausnahme bildet die Zymase. Buchner[1]) fand, daß der größte Teil der von ihm geprüften lipoidlöslichen Substanzen die Gärung von Hefepreßsaft bedeutend verlangsamte. 14 $^0/_0$ Aceton (2,4 m) und Äthylalkohol (3,0 m) verringerten sie um 80 $^0/_0$, 0,5 $^0/_0$ Phenol (0,053 m) um 40 $^0/_0$. Andererseits schien gesättigtes Chloroform sie nicht zu beeinflussen; ein überaus großer Chloroformüberschuß setzte sie um 64 $^0/_0$ herab. Warburg und Wiesel[2]) haben kürzlich nachgewiesen, daß der hemmende Einfluß der Glieder homologer Reihen auf Hefepreßsaft, wie die aliphatischen Alkohole, die Ketone, Urethane und Nitrile, mit ansteigendem Molekulargewicht rapid in die Höhe geht. So

[1]) Buchner, Die Zymasegärung von E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, München 1903.

[2]) Warburg und Wiesel, Arch. f. d. ges. Physiol. **144**, 465, 1912.

übten z. B. 0,2 m-Isoamylalkohol einen schädlicheren Einfluß als 5 m-Methylalkohol. Nach den letztgenannten Autoren liegt der Grund hierfür in dem Umstande, daß diese Substanzen in dem Hefepreßsaft einen Niederschlag herbeiführen, der sich, je höher die Glieder der homologen Reihe ansteigen, stärker ausprägt. Doch scheint es unwahrscheinlich, daß die Lipoidmembranen dieselbe Rolle bei der Tätigkeit der Zymase wie bei der Oxydase spielen, da die Wirkung dieser Narkotica auf Zymase eine reversible zu sein scheint. So beobachteten Warburg und Wiesel, daß die Gärung von Acetondauerhefe durch Glieder der oben erwähnten homologen Reihen ähnlich wie der Preßsaft geschädigt wurde. 3,5 m-Äthylalkohol (16 %ige Lösung) führten eine völlige Paralyse herbei. Im Gegensatz hierzu konnte ich konstatieren, daß Acetondauerhefe nach 17 stündigem Verweilen in einem 10 fachen Volumen reinen Äthylalkohols absolut ungeschädigt blieb. Nach Abgießen des Alkohols und Zusatz von Dextrose und Wasser ging eine gleichmäßige CO_2-Bildung in fast ganz demselben Tempo vor sich wie in einem Kontrollversuch, in dem die Hefe keine Alkoholbehandlung erfahren hatte. Nun fand ich aber, daß 8 m-Äthylalkohol (37 %ige Lösung) die Gewebsoxydase gänzlich inaktiviert. Der absolute Alkohol muß also, außer in dem Falle, daß er in die Wände der Hefezellen nicht einzudringen vermochte, alle solche Lipoidmembranen zerstört haben, die denjenigen, bei der Oxydasetätigkeit mitspielenden, vergleichbar sind. Daß ein Teil des Alkohols in die Hefezellwände eingedrungen ist, scheint durch die Versuche von Warburg und Wiesel über die Gärung von Acetondauerhefe ohne Zweifel bewiesen.

Zusammenfassung.

Wenn zerhackte Niere — oder ein anderes Gewebe — $^1/_2$ Stunde lang in einem Gemisch mit einem Narkoticum von irgendwelcher, bis zu einer gewissen Stärke ansteigenden Konzentration verweilt, so findet man, nachdem das Narkoticum ausgewaschen ist, die oxydierende Kraft der Gewebe einer Mischung von α-Naphthol und p-Phenylendiamin gegenüber entweder unbeeinträchtigt oder etwas erhöht. Bei größerer Konzentration des Narkoticums erleidet die Oxydase Schädigungen. Konzentrationen, die das Doppelte oder Dreifache der die Anfangs-

wirkungen herbeiführenden betragen, zerstörten sie vollständig. So wird die Oxydase durch 4,0 m-Aceton zuerst angegriffen, durch 7,0 m vernichtet. Bei Äthylalkohol erfolgt der Angriff bei 4,8 m, die Zerstörung bei 8,0 m; Phenol fängt mit 0,067 m an, eine Wirkung zu entfalten, mit 0,12 m tritt vollständige Hemmung ein; 1,1 m-Äthylurethan sind erforderlich zur ersten Einwirkung, 2,4 m zur gänzlichen Lähmung.

Die Konzentrationen der einwertigen aliphatischen Alkohole und Ketone, die 50 $^0/_0$ der Oxydase paralysieren, betragen ungefähr das 20fache der entsprechenden für Kaulquappen narkotischen Konzentrationen. Bei den Fettsäureestern und Methylurethan sind sie 12 mal so groß wie die entsprechenden Narkosewerte.

Gifte, abgesehen von den lipoidlöslichen Stoffen, haben einen viel ausgedehnteren Wirkungsbereich auf die Oxydase. So ist die Formaldehydkonzentration, welche die Oxydase gänzlich inaktiviert, 1330 mal so groß wie die zuerst einwirkende, bei Propylaldehyd verhalten sich diese Grenzwerte wie 1:40. Für das typische Narkoticum, Paraldehyd, lautet es dagegen nur 1:1,8. Der Wirkungsumfang von Ammoniak ist sogar noch weiter als von Formaldehyd, während Essig- und Milchsäure denjenigen der meisten Narkotica um ca. das 5fache übertreffen.

Die Konzentrationen der Narkotica, welche die Anfangswirkung verursachen, sind nur wenig höher als diejenigen, welche rote Blutkörperchen lackfarben machen. Daraus läßt sich die Folgerung ableiten, daß die Wirkung der Indophenoloxydase von Lipoiden abhängig ist, vielleicht von Lipoidmembranen, welche die Gewebsoxygenase und Peroxydase zusammenhalten und ihre gemeinsame enzymatische Tätigkeit ermöglichen.

Die katalytische Wirkung der Eisensalze bei der Leberautolyse.

Von

Luigi Pollini.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Clinica delle malattie professionali dei RR. Istituti clinici di perfezionamento di Milano.)

(Eingegangen am 21. November 1912.)

Preti[1]) hat nachgewiesen, daß die Salze mancher Metalle (Eisen, Mangan, Blei, Platin, Aluminium, Kobalt, Kupfer, Natrium) die Eigenschaft besitzen, die Leberautolyse zu beeinflussen, und zwar wird diese durch die Eisen-, Mangan-, Blei-, Platin- und Kobaltsalze begünstigt, durch die Kupfer- und Natriumsalze hingegen behindert.

Diese Ergebnisse hatten nun aber zu noch anderen Untersuchungen angeregt, die den Zweck verfolgten, zu ermitteln, auf welche stickstoffhaltige Fraktionen die genannten Salze ganz besonders einwirken. Schon in einer nachträglichen Arbeit hatte sich Preti[2]) daran gemacht, diese Einwirkung festzustellen. Seine Versuche beziehen sich auf die Bleisalze: es ergab sich, daß durch Zusatz von kleinen bzw. mittleren Dosen der Salzlösung zu Leberbrei die Bildung des Gesamtstickstoffes sowie des N der Monoaminosäuren und der Purinbasen gefördert, durch Zusatz von starken Salzmengen hingegen gehindert wurde, und daß die Albumosen durch einfache Autolyse abnahmen, während sie durch Zusatz von schwachen, mittleren und starken Mengen von Bleisalzen eine fortschreitende Zunahme erfuhren.

Im Hinblick auf die Wichtigkeit dieser Frage habe ich es für zweckmäßig gehalten, die Untersuchungen in dieser Richtung fortzusetzen, um zunächst die Wirkung festzustellen, die manche

---

[1]) Preti, Zeitschr. f. physiol. Chem. 60.

[2]) Derselbe, Zeitschr. f. physiol. Chem. 58.

Eisensalze auf die nach Maßgabe der hierbei erfolgenden Bildung des Gesamtstickstoffes, des N der Monoaminosäuren, der Albumosen und der Purinbasen bewertete Leberautolyse auszuüben vermögen. Die von mir zu den Versuchen verwendeten Salze waren Ferrisulfat, Eisenchlorid, Eisencitrat und Eisenlactat; als Versuchsmaterial benutzte ich Kalbsleber. Das hierbei angewandte Verfahren ist das gleiche wie das von Preti befolgte.

Ferrisulfat.

100 g Kalbsleber + 500 ccm physiol. Kochsalzlösung + 5 ccm Chloroform + $^{1}/_{10}$-Lösung Eisenoxydsulfat.

Nach dreitägigem Verweilen im Thermostaten bei 37° wurde das Gemenge mit 500 ccm destilliertem Wasser versetzt, hierauf behufs Entfernung der gerinnbaren Eiweißstoffe mit 5%iger Essigsäure schwach angesäuert und zum Sieden gebracht. Nach erfolgter Abkühlung wurde das Ganze auf das erforderliche Volum gebracht und filtriert. Dem Filtrat wurden 800 ccm entnommen, im Wasserbad auf 400 ccm eingedampft und abermals filtriert. In 20 ccm des Filtrats wurde der Gesamtstickstoff, in 50 der N der Monoaminosäuren, in 50 der N der Albumosen und in 100 der N der Purinbasen bestimmt.

Tabelle I.

Probe-nummer	Dauer der Autolyse	Ferrisulfat-lösung	Gesamt-N g	Mono-amino-säuren-N g	Purin-basen-N mg
1	0	0	0,224	0,078	10,10
2	3 Tage	0	0,367	0,162	66,26
3	3 „	$^{1}/_{10}$-N 2 ccm	0,367	0,157	64,02
4	3 „	„ 5 „	0,373	0,162	63,46
5	3 „	„ 10 „	0,387	0,151	66,83

Tabelle II.

Probe-nummer	Dauer der Autolyse	Ferrisulfat-lösung	Gesamt-N g	Mono-amino-säuren-N g	Purin-basen-N mg
1	0	0	0,214	0,080	35,87
2	3 Tage	0	0,438	0,198	70,20
3	3 „	$^{1}/_{10}$-N 10 ccm	0,448	0,162	78,06
4	3 „	„ 25 „	0,494	0,249	78,62
5	3 „	„ 50 „	0,485	—	—
6	3 „	„ 100 „	0,668	0,298	134,78

Tabelle III.

Probe-nummer	Dauer der Autolyse	Ferrisulfat-lösung	Gesamt-N g	Mono-amino-säuren-N g	Purin-basen-N mg
1	0	0	0,244	0,105	37,0
2	3 Tage	0	0,438	0,204	68,5
3	3 "	$^1/_{10}$-N 25 ccm	0,477	0,228	74,1
4	3 "	" 50 "	0,555	0,268	75,8
5	3 "	" 100 "	0,601	0,359	79,7

Tabelle IV.

Probe-nummer	Dauer der Autolyse	Ferrisulfat-lösung	Gesamt-N g	Mono-amino-säuren-N g	Albu-mosen-N mg	Purin-basen-N mg
1	0	0	0,238	0,089	101,00	32,1
2	3 Tage	0	0,395	0,181	89,80	73,5
3	3 "	$^1/_{10}$-N 25 ccm	0,421	0,227	113,98	76,3
4	3 "	" 50 "	0,495	0,259	98,80	78,6
5	3 "	" 100 "	0,558	0,350	101,08	78,6
6	3 "	" 200 "	0,640	—	113,05	—

Tabelle V.

Probe-nummer	Dauer der Autolyse	Ferrisulfat-lösung	Gesamt-N g	Mono-amino-säuren-N g	Albu-mosen-N mg	Purin-basen-N mg
1	0	0	0,298	0,101	111,90	37,6
2	3 Tage	0	0,396	0,185	90,97	65,1
3	3 "	$^1/_{10}$-N 25 ccm	0,448	0,202	—	69,6
4	3 "	" 50 "	0,505	0,243	92,10	74,6
5	3 "	" 100 "	0,553	0,271	92,10	75,2
6	3 "	" 200 "	0,693	0,384	99,9	64,5

Aus den in der Tabelle I bis V mitgeteilten Protokollen ergibt sich nun folgendes:

Durch Zusatz von $^n/_{10}$-Eisensulfatlösung zu 100 g Leberbrei in einer Dosis von 5 bis 200 ccm wird die Leberautolyse begünstigt. So sind die durch Zusatz von wachsenden Dosen von Eisensulfat (Eisenoxydul) erhaltenen Mengen des Gesamtstickstoffes im einzelnen größer als die bei den Kontrollen sich herausstellenden und nehmen auch von den nur geringe Mengen enthaltenden Proben bis zu den größere Mengen enthaltenden

progressiv zu. Bei den Monoaminosäuren, den Albumosen und den Purinbasen tritt das gleiche ein. Die genannten Stoffe sind in den in Gegenwart von Eisensulfat der Autolyse überlassenen Proben in größerer Menge vorhanden als in jenen, die keinen Salzzusatz bekommen haben. Hierbei hält die gefundene Menge gleichen Schritt mit jener des zugesetzten Eisenoxydsulfats.

Eisenchlorid.

100 g Kalbsleber + 500 ccm physiol. Kochsalzlösung + 5 ccm Chloroform + n/10-Lösung Eisenchlorid; hierauf das gleiche Verfahren wie vorher.

Tabelle VI.

Probe-Nr.	Dauer der Autolyse	Eisenchloridlösung	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N mg	Purinbasen-N mg
1	0	0	0,174	0,073	98,62	11,23
2	3 Tage	0	0,491	—	89,80	39,87
3	3 „	1/10-N 2 ccm	0,463	0,226	—	39,31
4	3 „	„ 5 „	0,505	—	77,50	44,92
5	3 „	„ 10 „	0,600	0,334	94,34	44,92
6	3 „	„ 75 „	0,851	0,330	128,04	43,80
7	3 „	„ 100 „	0,842	0,308	194,31	33,60

Tabelle VII.

Probe-Nr.	Dauer der Autolyse	Eisenchloridlösung	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N mg	Purinbasen-N mg
1	0	0	0,182	0,101	53,91	11,23
2	3 Tage	0	0,275	0,190	66,26	44,92
3	3 „	1/10-N 10 ccm	0,564	0,285	73,00	56,16
4	3 „	„ 25 „	0,737	0,312	74,13	60,09
5	3 „	„ 50 „	0,991	0,402	93,27	61,77
6	3 „	„ 100 „	0,972	0,413	123,50	50,54

Tabelle VIII.

Probe-Nr.	Dauer der Autolyse	Eisenchloridlösung	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N mg	Purinbasen-N mg
1	0	0	0,244	0,050	60,65	11,23
2	3 Tage	0	0,463	0,204	92,10	53,91
3	3 „	1/10-N 25 ccm	0,714	0,409	112,00	73,00
4	3 „	„ 50 „	1,067	0,539	143,70	87,04
5	3 „	„ 100 „	0,870	—	308,80	—

Durch Zusatz von 2 bis 75 ccm einer $^n/_{10}$-Lösung Eisenchlorid zu 100 g Kalbsleberbrei wird die Autolyse gefördert. Die durch Zusatz von wachsenden Salzmengen erhaltenen Quantitäten des Gesamtstickstoffes nehmen parallel zur gesteigerten Menge des hinzugesetzten Salzes progressiv zu. Die Monoaminosäuren, die Albumosen und die Purinbasen verhalten sich ähnlich wie Gesamtstickstoff, d. h. es nimmt ihr N dort zu, wo auch der Gesamtstickstoff zugenommen hat.

Eisencitrat.

100 g Kalbsleber + 500 ccm physiol. Kochsalzlösung + 5 ccm Chloroform + $^n/_{10}$-Eisencitrat; hierauf das gleiche Verfahren wie vorher.

Tabelle IX.

Probe-Nr.	Dauer der Autolyse	Eisencitratlösung	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N mg	Purinbasen-N mg
1	0	0	0,365	0,132	96,37	25,27
2	3 Tage	0	1,342	0,819	211,08	76,93
3	3 „	$^1/_{10}$-N 2 ccm	0,939	0,393	134,70	73,00
4	3 „	„ 5 „	1,066	0,466	129,16	78,62
5	3 „	„ 10 „	1,157	0,667	226,04	78,62
6	3 „	„ 20 „	1,241	0,765	162,86	78,06

Tabelle X.

Probe-Nr.	Dauer der Autolyse	Eisencitratlösung	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N mg	Purinbasen-N mg
1	0	0	0,210	0,084	90,0	20,84
2	3 Tage	0	0,547	0,238	110,2	46,05
3	3 „	$^1/_{10}$-N 2 ccm	0,443	0,215	105,4	44,96
4	3 „	„ 5 „	0,463	0,198	108,6	47,93
5	3 „	„ 10 „	0,684	0,280	115,6	50,20
6	3 „	„ 20 „	0,912	0,449	119,0	57,28

Tabelle XI.

Probe-Nr.	Dauer der Autolyse	Eisencitratlösung	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N mg	Purinbasen-N mg
1	0	0	0,214	0,098	71,66	33,69
2	3 Tage	0	0,800	0,342	99,80	67,39
3	3 „	$^1/_{10}$-N 10 ccm	0,631	0,330	60,65	54,03
4	3 „	„ 20 „	0,853	0,511	73,00	60,65
5	3 „	„ 40 „	1,089	0,505	101,09	73,00
6	3 „	„ 60 „	0,760	0,555	104,45	48,85

Die vom Eisencitrat auf die autolytischen Vorgänge ausgeübte Wirkung ist komplizierter als die der vorhergehenden Salze: durch kleine Mengen wird die Autolyse behindert, durch größere begünstigt, durch noch größere vereitelt.

Bei Zusatz von 2 bis 10 ccm der $^{n}/_{10}$-Salzlösung (Tabelle IX bis XI) zeigt der Gesamtstickstoff im Vergleich zur Kontrollprobe eine Abnahme, bei Zusatz von 20 bis 40 ccm hingegen eine Zunahme, bei 60 ccm wieder eine Abnahme.

Der N der Monoaminosäuren und der Albumosen verhält sich in ähnlicher Weise wie der Gesamtstickstoff.

Der N der Albumosen hat durch Zusatz von 2 bis 10 ccm $^{n}/_{10}$-Salzlösung eine Abnahme erfahren, durch jenen von größeren Mengen zeigt er hingegen eine progressive Zunahme.

Eisenlactat.

100 g Kalbsleber + 500 ccm physiol. Kochsalzlösung + 5 ccm Chloroform + $^{n}/_{10}$-Eisenlactat; Verfahren wie vorher.

Tabelle XII.

Probe-Nr.	Dauer der Autolyse	Eisenlactatlösung	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N mg	Purinbasen-N mg
1	0	0	0,210	0,115	89,85	36,50
2	3 Tage	0	0,988	0,517	157,24	71,88
3	3 „	$^{1}/_{10}$-N 10 ccm	0,954	0,482	129,16	70,76
4	3 „	„ 50 „	0,842	0,438	134,70	122,42
5	3 „	„ 100 „	0,828	0,432	151,63	117,37
6	3 „	„ 200 „	0,772	0,404	190,90	109,51

Tabelle XIII.

Probe-Nr.	Dauer der Autolyse	Eisenlactatlösung	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N mg	Purinbasen-N mg
1	0	0	0,308	0,134	44,90	—
2	3 Tage	0	1,586	0,906	255,80	137,59
3	3 „	$^{1}/_{10}$-N 5 ccm	1,502	0,832	247,10	122,42
4	3 „	„ 10 „	1,418	—	235,80	117,93
5	3 „	„ 25 „	1,347	—	219,02	113,44
6	3 „	„ 50 „	1,291	0,803	168,40	115,12
7	3 „	„ 100 „	1,347	—	155,00	98,84

Tabelle XIV.

Probe-Nr.	Dauer der Autolyse	Eisenlactat-lösung	Gesamt-N g	Mono-amino-säuren-N g	Albu-mosen-N mg	Purin-basen-N mg
1	0	0	0,289	0,129	70,76	16,84
2	3 Tage	0	0,555	0,314	119,05	66,26
3	3 "	$^1/_{10}$-N 2 ccm	0,603	0,312	115,68	68,51
4	3 "	" 5 "	0,555	0,304	101,00	71,32
5	3 "	" 10 "	0,519	0,285	101,00	66,83
6	3 "	" 50 "	0,511	0,267	84,24	67,39

Tabelle XV.

Probe-Nr.	Dauer der Autolyse	Eisenlactat-lösung	Gesamt-N g	Mono-amino-säuren-N g	Albu-mosen-N mg	Purin-basen-N mg
1	0	0	0,126	0,056	50,57	13,72
2	3 Tage	0	0,336	0,195	96,61	25,28
3	3 "	$^1/_{10}$-N 2 ccm	0,351	—	105,59	28,08
4	3 "	" 5 "	0,376	0,213	101,00	30,88
5	3 "	" 10 "	0,407	0,207	84,44	25,28
6	3 "	" 25 "	0,359	0,172	87,60	25,28
7	3 "	" 50 "	0,322	0,176	73,00	25,94

Die mit Eisenlactat erzielten Resultate (Tabellen XII bis XV) erscheinen untereinander in Widerspruch: Bei manchen Versuchen hat nämlich dieses Salz, wenn auch in demselben Mengenverhältnis gebraucht, eine günstige, bei anderen hingegen eine hemmende Wirkung ausgeübt. Eine Erklärung hierfür ließe sich vielleicht in der Annahme finden, daß hier noch andere, nicht nachweisbare Stoffe hinzugetreten sind, die den autolytischen Prozeß beeinflußt haben. Im allgemeinen aber wird die Wahrnehmung gemacht, daß die Wirkung des Eisenlactats in einem Mengenverhältnis von 2 bis 5 ccm $^n/_{10}$-Lösung eine günstige ist; der Gesamtstickstoff hat nämlich im Vergleich zur Kontrolle zugenommen, während größere Mengen — von 10 bis 150 ccm — eine mit der stärkeren Menge des zugesetzten Salzes gleichen Schritt haltende Verminderung des Gesamtstickstoffes bewirken.

Der N der einzelnen Fraktionen (Monoaminosäuren, Albumosen) zeigt das gleiche Verhalten wie der Gesamtstickstoff.

Sieht man sämtliche Protokolle durch, so findet man, daß die von mir untersuchten Salze eine günstige Wirkung auf die Leberautolyse ausüben, was die von Preti[1]) erzielten Resultate bestätigt. Eine Erscheinung ist mir hierbei bezüglich der organischen Salze aufgefallen: dieselben zeigen ein besonderes Verhalten. Während nämlich die anorganischen (Eisenoxydul, Eisenchlorid) in einem Mengenverhältnis von 2 bis 100 ccm $^n/_{10}$-Lösung, zu Leberbrei zugesetzt, die Autolyse fördern, ist die Wirkung der organischen keine so einfache und regelmäßige. Eisencitrat, in einem Mengenverhältnis von 2 bis 10 ccm einer $^n/_{10}$-Lösung, hindert die Autolyse, begünstigt dieselbe in einem solchen von 20 bis 40 ccm, um sie jedoch bei Zusatz von größeren Mengen abermals zu hindern. Eisencitrat wirkt fördernd, wenn 1 bis 5 ccm einer $^n/_{10}$-Lösung desselben zugesetzt werden; durch größere Mengen wird die Autolyse gehemmt.

Was aber die von diesen Salzen auf die von mir untersuchten stickstoffhaltigen Fraktionen anbetrifft, so sieht man, daß die von denselben auf die Monoaminosäuren und Albumosen ausgeübte Wirkung identisch ist mit jener auf den Gesamtstickstoff. So wirken die anorganischen Salze (Eisensulfat und Eisenchlorid) in einem Mengenverhältnis von 2 bis 100 ccm $^n/_{10}$-Lösung stets günstig, während die organischen (Citrat und Lactat), wie man bereits gesehen, in bezug auf den Gesamtstickstoff ein minder regelmäßiges Verhalten zeigen, und zwar wird durch das Citrat, bei Anwendung von 2 bis 10 ccm $^n/_{10}$-Lösung, die Autolyse gehindert, bei Anwendung von 20 bis 40 ccm gefördert, bei jener von noch größeren Mengen wiederum gehindert. Eisenlactat wirkt in geringen Mengen begünstigend (2 bis 5 ccm $^n/_{10}$-Lösung), hindernd hingegen in größeren.

Das gleiche wie bei den Monoaminosäuren und Albumosen tritt auch bei den Purinbasen ein, mit dem Unterschied aber, daß die Wirkung auf diese letzteren eine minder auffällige ist.

Es ist nicht möglich, für den — wenn auch nur geringen — zwischen organischen und anorganischen Salzen sich geltend machenden Unterschied eine Erklärung zu finden; wahrscheinlich ist derselbe auf die Verschiedenheit des Aggregatzu-

[1]) loc. cit.

standes der Salze, auf manche ihnen zukommende abweichende physikalische Eigenschaften (so z. B. den verschiedenen Löslichkeitsgraden — die organischen Salze sind weniger löslich als die anorganischen —, die bei den anorganischen entschieden saure, bei den organischen hingegen nur schwach saure Reaktion) zurückzuführen.

Eine bei meinen verschiedenen Untersuchungen wiederholt gemachte Erfahrung ist die, daß das Optimum des Salzzusatzes keineswegs ein konstantes, sondern ein von Leber zu Leber wechselndes ist. Dies ist durch die Verschiedenheit der fermentativen Natur des autolytischen Prozesses sowie durch die mit dem Alter, der Ernährung und der Verdauung zusammenhängenden Differenzen bedingt.

Die Resultate der mitgeteilten Untersuchungen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Durch Zusatz von kleinen und großen Mengen von Eisenoxydsulfat und Eisenchlorid zu einem der Autolyse überlassenen Kalbsleberbrei wird die Bildung des Gesamtstickstoffes, des N der Monoaminosäuren, der Albumosen und der Purinbasen gefördert.

2. Kleine Mengen von Eisencitrat, zu einem der Autolyse überlassenen Kalbsleberbrei hinzugesetzt, üben eine schwach hemmende Wirkung aus, mittlere Mengen hingegen eine begünstigende; durch starke Mengen wird die Autolyse für den Gesamtstickstoff sowie für den N der Monoaminosäuren wiederum gehemmt. Die durch kleine Mengen von Eisencitrat eine Abnahme erfahrenden Albumosen nehmen bei Anwendung von wachsenden Mengen dieses Salzes stetig zu.

3. Wird zu einem der Autolyse überlassenen Kalbsleberbrei Eisenlactat in äußerst geringen Mengen zugesetzt, so wird die Autolyse begünstigt; durch wachsende Mengen wird progressive Hemmung bedingt, sowohl für den Gesamtstickstoff als auch für den N der Monoaminosäuren und der Albumosen.

Über zuckerfreie Hefegärungen. IX.

Vergärung von Ketosäuren durch Weinhefen.

Von

C. Neuberg und J. Kerb.

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

Mit 1 Figur im Text.

Ein prinzipieller Fortschritt in der Erkenntnis vom Wesen der alkoholischen Gärung muß darin erblickt werden, daß endlich eine Säure ermittelt ist, die ohne eigentliche Zugehörigkeit zur Kohlenhydratreihe aus gärfähigen Zuckern hervorgehen kann und mit Hefe ebenso leicht in Gärung gerät wie Traubenzucker selbst. Diese Substanz fanden Neuberg und seine Mitarbeiter in der Brenztraubensäure (1910, 1911).

Damit ist wenigstens die Schwierigkeit überwunden, die Entstehung von Kohlendioxyd bei der Gärung zu erklären; bei der Struktur der Hexosen ist eine direkte Abspaltung von CO_2 aus Zuckerarten unmöglich. Nur aus einer Carbonsäure kann Kohlensäure durch Decarboxylierung so prompt abgespalten werden, wie es beim Gärungsvorgange geschieht. Brenztraubensäure stellt aber die erste bekannt gewordene Säure dar, die durch lebende Hefen oder ein daraus darstellbares Enzym, die Carboxylase[1]), in wirklich glatter Weise vergoren wird.

Als zweites Produkt dieser Zerlegung tritt nach der experimentell von Neuberg und Karczag[1]) bewiesenen Gleichung:

$$CH_3 . CO . COOH = CO_2 + CH_3 . COH$$

Acetaldehyd auf.

Es ist unentschieden, auf welche Weise der Äthylalkohol der gewöhnlichen Gärung entsteht. Die Erkenntnis, daß außer den Hexosen die 3-Kohlenstoffzucker gären, hat an sich diese Frage nicht geklärt. Denn das Rätsel ist das gleiche, ob

[1]) C. Neuberg und L. Karczag, diese Zeitschr. 36, 68 u. 76, 1911.

$C_3H_6O_3$ in $CO_2 + C_2H_5OH$ zerfällt, oder $C_6H_{12}O_6$ in $2CO_2 + 2C_2H_5OH$. Die Lösung der Aldolbindung zwischen dem dritten und vierten Kohlenstoffatom der Hexosen, die Umkehrung der Fischerschen Zuckersynthese, ist nicht der Prozeß, der dem Verständnis Schwierigkeiten bereitet. Diese treten erst auf bei der experimentellen Herleitung der Gruppe $CH_3.CH_2OH$ aus den Gebilden $CH_2OH(CHOH)_xCOH$ bzw. $H.(CHOH)_x.CO.CH_2OH$.

Auf alle Fälle steht der bei der Brenztraubensäuregärung glatt und schnell gebildete Acetaldehyd in so naher Beziehung zum Äthylalkohol, wie keine andere Substanz, die jemals mit der Gärungsfrage in Zusammenhang gebracht worden ist!

Die Brenztraubensäure, $C_3H_4O_3$, die in verschiedener Weise — durch das Methylglyoxal[1]), $C_3H_4O_2$, oder die Glycerinsäure[2]), $C_3H_6O_4$ — mit den Triosen verknüpft ist, stellt unzweifelhaft ein Oxydationsprodukt der 3-Kohlenstoffzucker dar. Ob dieses durch ein entsprechendes Reduktionsprodukt[1])[3]) der Triosen, durch Glycerin, $C_3H_8O_3$, oder durch Acetol bzw. Milchsäurealdehyd, $C_3H_6O_2$, in Alkohol und Kohlendioxyd übergeführt wird, wie Neuberg und seine Mitarbeiter in Erwägung gezogen hatten, ist nicht mit Sicherheit entschieden. Ganz ebenso steht es mit der Frage, ob die irgendwie bei dem oxydativen Übergang von Triose in Brenztraubensäure frei werdende Reduktionsenergie — einem zerlegten Molekül $H_2O = O + H_2$ entstammend — nicht von geeigneten chemischen Substanzen, sondern von einer Reduktase aufgenommen oder im Sinne einer gekoppelten Reaktion bei der Vergärung von Brenztraubensäure sofort auf den entstehenden Acetaldehyd übertragen wird [Kostytschew[4]), A. v. Lebedew[5])].

In jedem Falle wird die Brenztraubensäure auch eine Muttersubstanz des Gärungsäthylalkohols darstellen und die Carboxylase für die Entstehung des Kohlendioxyds durch das heute Zymase genannte Enzymsystem von ausschlaggebender Bedeutung sein.

---

[1]) C. Neuberg und A. Hildesheimer, diese Zeitschr. **31**, 172, 1911.
[2]) C. Neuberg und A. Hildesheimer, ebendas. S. 176.
[3]) C. Neuberg und J. Kerb, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **1**, 114, 1912.
[4]) S. Kostytschew, Zeitschr. f. physiol. Chem. **79**, 130, 1912. — S. Kostytschew und E. Hübbenet, ebendas. **79**, 361, 1912.
[5]) A. v. Lebedew, diese Zeitschr. **46**, 483, 1912.

Nachdem durch die Untersuchungen von P. Mayer[1]) und Tschernorutzki[2]) aus dem hiesigen Laboratorium die Beziehungen der Brenztraubensäure auch zum Kohlenhydratstoffwechsel des Tieres erkannt sind, haben Rona und Neukirch[3]) die Gleichwertigkeit dieser Säure mit Glucose ebenfalls als Energiequelle für den Herzmuskel wie für den Darm festgestellt. Ferner zeigten Neuberg[4]) sowie Embden und Oppenheimer[5]) einen Zusammenhang der Brenztraubensäure mit den Acetonkörpern, den der Acetaldehyd vermittelt.

Die zentrale Stellung, die somit auf einmal die Brenztraubensäure gewonnen hat, läßt es erwünscht erscheinen, das Verhalten der Substanz zu möglichst vielen verschiedenen Organismen zu untersuchen.

Wir haben Versuche mit Bakterien und Pilzen[6]) begonnen und berichten zunächst über die Einwirkung der Weinhefen, da diese in biologischer Hinsicht sich etwas abweichend von den gewöhnlichen Erregern der alkoholischen Gärung verhalten. Wir haben früher eine größere Reihe von ober- und untergärigen Hefen, die für die Bier- und Branntweinfabrikation dienen, in Reinzucht untersucht und sie ausnahmslos zur Vergärung der Brenztraubensäure befähigt gefunden.

Ihnen an schließen sich nun die Weinhefen, die uns durch das Entgegenkommen der Kgl. Preußischen Lehranstalt für Wein-, Obst- und Gartenbau zu Geisenheim a. Rh. zugänglich waren. Insbesondere schulden wir den Herren Prof. K. Krömer und Prof. C. von der Heide Dank für die Überlassung des wertvollen Materials, ebenso Herrn Dr. R. von der Heide.

Zu Gebote standen uns mehrere reingezüchtete Weinhefen. Sie wurden teils auf einer künstlichen Weinsäure-Malzwürze, teils auf sterilisiertem natürlichen Most kultiviert.

---

[1]) P. Mayer, diese Zeitschr. **40**, 441, 1912.

[2]) M. Tschernorutzki, diese Zeitschr. **43**, 486, 1912.

[3]) P. Rona und P. Neukirch, Arch. f. d. ges. Physiol. **144**, 555, 1912; **146**, 371, 1912; **148**, 285, 1912.

[4]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **43**, 491, 1912.

[5]) G. Embden und M. Oppenheimer. diese Zeitschr. **45**, 186, 1912.

[6]) Neuerdings haben W. Zaleski und E. Marx (diese Zeitschr. **47**, 184, 1912) Carboxylase auch in höheren Pflanzen, so in Erbsensamen, nachgewiesen.

In völlig reiner Form konnten wir 4 Rassen benutzen, die als Weinhefe Geisenheim, Johannisberg, Oppenheimer Kreuz und Winningen bezeichnet wurden, ferner eine reine Mischrasse, welche die Weinhefen Aßmannshausen, Johannisberg und Winningen enthielt.

Zu unseren Versuchen wurden die Weinhefen auf einer Porzellannutsche abgesaugt und mit Leitungswasser 6 bis 8 mal gründlich ausgewaschen. Die restierenden, scharf abgepreßten Weinhefen bildeten hellgelbe oder bräunlichgelbe Massen, die in diesem Zustande sofort zur Verwendung gelangten.

Sämtliche Weinhefen wirkten auf Brenztraubensäure und zerlegten sie in Kohlendioxyd und Acetaldehyd.

Zum Vergleich wurde jedesmal eine Probe mit Traubenzucker und eine Kontrolle mit Wasser angestellt.

Zur Verwendung gelangten 1%ige Lösungen von freier Brenztraubensäure und von reiner d-Glucose. 12 ccm dieser Lösungen bzw. 12 ccm Leitungswasser wurden mit 1 g der betreffenden Hefe in Reagensgläsern gut durchgeschüttelt; die Suspension wurde alsdann in Schröttersche Gärröhrchen[1]) gefüllt.

Die Ergebnisse sind in folgenden Tabellen wiedergegeben.

A. Auf Weinsäurewürze gezüchtete Hefen.

Weinhefe	Kohlensäure in ccm, entwickelt											
	aus 1%iger Brenztraubensäurelösg. nach				aus 1%iger Traubenzuckerlösg. nach				mit Wasser nach			
	2 St.	6 St.	24 St.	48 St.	2 St.	6 St.	24 St.	48 St.	2 St.	6 St.	24 St.	48 St.
Winningen	0	1	4	10[1])	0	1,5	3	9	0	0	0	0
Johannisberg . .	0,5	2,5	6	10	0	3	5	10	0	0	Spur	0,5

B. Auf sterilem Most gezüchtete Hefen.

Weinhefe	Kohlensäure in ccm, entwickelt								
	aus 1%iger Brenztraubensäurelösg. nach			aus 1%iger Traubenzuckerlösg. nach			mit Wasser nach		
	1 St.	3 St.	18 St.	1 St.	3 St.	18 St.	1 St.	3 St.	18 St.
Geisenheim . . .	1	3	8	2	3	7	0	0	0,5
Johannisberg . .	1,5	2	7	2	3	8	0	0	0
Oppenheimer Kreuz	2,5	6	10	3	6	10	0	0	0
Winningen	2	4,5	10	1,5	5	10	0	0	Spur
Mischrasse	2	5,5	10	1,5	5	10	0	0	Spur

[1]) In ihnen konnten sich bei vollständiger Ausgärung 10 ccm Gas ansammeln.

Die auf natürlichem Most gezüchteten Hefen haben eine etwas größere Gärenergie. Die Unterschiede machen sich gegenüber Brenztraubensäure und d-Glucose in gleicher Weise geltend; sie sind wohl ohne Zwang auf den ungleichen Ernährungszustand in den beiden Arten von Substraten zurückzuführen.

Genau wie in unseren früheren Gärversuchen mit Brenztraubensäure und Brauerei- sowie Brennereihefen sind Täuschungen durch etwaige Selbstgärung, wie schon ein Blick auf die zeitlichen Verhältnisse der Tabellen lehrt, vollständig ausgeschlossen.

Wir haben jedoch nicht unterlassen, die Natur der aus Brenztraubensäure entstehenden Produkte zu prüfen. Das entwickelte Gas war reine Kohlensäure, d. h. vollständig durch Kalilauge absorbierbar. Der gebildete Acetaldehyd verriet sich bereits durch den Geruch; er wurde ferner durch die Probe mit Nitroprussidnatrium und Diäthylamin identifiziert. Diese Reaktion kann mit 5 ccm des Gärgutes ausgeführt werden, das man mit einer Pipette dem offenen Schenkel des Gärungsröhrchens entnimmt und nach Verdünnung mit etwa 10 ccm Wasser aus einem kleinen Kölbchen unter Kühlung abdestilliert, bis 3 oder 4 ccm übergegangen sind. Auch ohne Destillation kann die Prüfung auf Acetaldehyd direkt im Gärgut geschehen, da (unveränderte) Brenztraubensäure mit Nitroprussidnatrium und Diäthylamin[1]) nicht reagiert, während die Blauviolettfärbung durch Acetaldehyd deutlich ist.

Über den Grad, in dem die Brenztraubensäure zerlegt wird, haben wir uns durch zwei

quantitative Versuche

Aufklärung verschafft.

Dieselben wurden in der Weise vorgenommen, daß die Brenztraubensäure in 1 $^0/_0$iger Lösung mit den Hefen bei 28^0 im Brutschrank 4—5 Tage vergoren wurde. Durch eine im Thermostaten vorhandene Öffnung führte ein Gasentbindungsrohr nach außen. Dasselbe tauchte, wie nachstehendes Schema veranschaulicht, in eine mit Wasser beschickte Vorlage, während der obere Teil mit einem Kühler umkleidet wurde. Durch Kühlung der

[1]) Im Gegensatz zu Kalilauge.

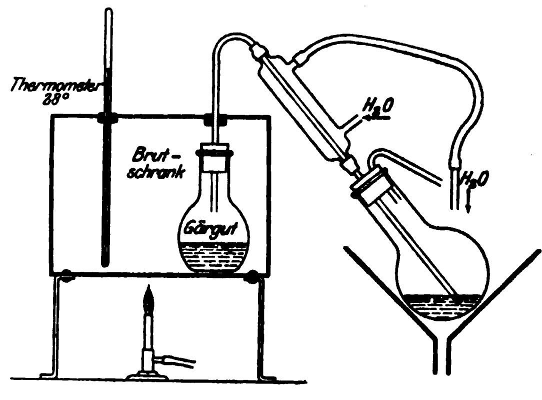


Fig. 1.

Vorlage wurde erreicht, daß die bei der Gärung entweichende Kohlensäure keine in Betracht kommenden Mengen Aldehyd entführte, sondern daß dieser im kalten Wasser zurückgehalten wurde. Nach Beendigung der Gärung wurde der im Gärgut gelöste Acetaldehyd durch Abdestillieren in die gleiche Vorlage übergetrieben. Durch Fällung mit einer klar filtrierten Lösung von essigsaurem p-Nitrophenylhydrazin wurde der Acetaldehyd ohne weiteres abgeschieden. Es entstand fast sofort eine dicke, fast breiige Fällung von hellgelber Farbe.

Versuch I wurde mit 4,0 g Brenztraubensäure und 30 g feuchter Weinhefe „Oppenheimer Kreuz" angesetzt und lieferte 2,05 g reines Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon.

Versuch II mit 2,2 g Brenztraubensäure und 10 g Weinhefe „Mischrasse" ergab 1,72 g Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon.

Da 179 g p-Nitrophenylhydrazon 44 g Acetaldehyd und diese 88 g Brenztraubensäure entsprechen, betrug die Ausbeute bei I rund 25%, bei II ziemlich genau 40% der theoretisch möglichen Menge.

Die Brenztraubensäure wird demnach durch die Weinhefen weitgehend[1]), und, wie die Tabellen auf S. 408 zeigen, ziemlich rasch, ungefähr ebenso schnell wie Traubenzucker, vergoren.

---

[1]) Daß die Brenztraubensäure nicht wie Zucker zu fast 100% vergoren wird, ist nicht verwunderlich; denn sowohl die freie Ketosäure wie der bei der Gärung entstehende Acetaldehyd sind Hefengifte.

Daß alle Hefen lediglich einem „Zufallsenzym“ diese Fähigkeit zur Brenztraubensäurevergärung verdanken sollten, ist mehr als unwahrscheinlich.

Übrigens haben wir auch bei den Weinhefen die Fermentnatur der Brenztraubensäuregärung nachgewiesen. In wässeriger Suspension gekochte Hefe ist ohne Einwirkung auf die Ketosäure. Um einen Saft nach v. Lebedews[1]) vortrefflicher Vorschrift herzustellen, hatten wir hier nicht Material genug. Wir beschränkten uns daher darauf, die Weinhefe nach v. Lebedews Angaben vorsichtig zu trocknen. Wir gelangten nach seinem bewährten Verfahren auch zum Ziele. Die getrocknete Weinhefe „Mischrasse“ vergor in Gegenwart von Toluol 1 $^0/_0$ige Brenztraubensäurelösung, wenn auch recht langsam, wodurch der enzymatische Charakter der Reaktion sichergestellt ist.

Endlich haben wir die Weinhefen noch auf ihr Verhalten zu anderen Ketosäuren geprüft, und zwar zu Oxalessigsäure, $COOH—CO—CH_2—COOH$, und zu α-Keton-buttersäure, $CH_3—CH_2—CO—COOH$, dem nächst höheren Homologen der Brenztraubensäure (s. hierzu S. 413). Beide Ketosäuren wurden angegriffen, die Ketobuttersäure geradezu stürmisch.

Außer für die Theorie der alkoholischen Gärung hat die Zerlegung der Ketosäuren durch Weinhefen noch ein doppeltes Interesse. Man muß immerhin in Betracht ziehen, daß die im Wein reichlich präformierten Säuren[2]) durch den Gärakt zum Teil über die Ketosäuren abgebaut werden können. Z. B. wäre dieses für die Weinsäure und die Äpfelsäure sowie Milchsäure denkbar, von denen die erste durch einfache intramolekulare Wasserabspaltung (Wohl und Österlin[3]), die beiden anderen durch glatte Oxydation in Oxalessigsäure und Brenz-

---

[1]) A. v. Lebedew, Zeitschr. f. physiol. Chem. 73, 447, 1911.

[2]) Bekanntlich findet bei der Vergärung von Mosten ein Säurerückgang statt. Neben anderen Faktoren scheint dabei auch die Hefe als Säurekonsument zu fungieren. Vgl. hierzu die Darlegungen bei Julius Wortmann, „Weinbereitung und Kellerwirtschaft“, 1905, 190ff., sowie bei Karl Windisch, „Die chemischen Vorgänge beim Werden des Weins“, 1906, 64ff.

[3]) A. Wohl und C. Österlin, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 34, 1139, 1901.

traubensäure übergehen können. Ferner dürften sich die bei diesen Gärungen entstehenden überaus reaktionsfähigen Aldehyde, analog den höheren Alkoholen [F. Ehrlich[1])], an der Bouquetbildung als solche oder in Form von Acetalen und Kondensationsprodukten beteiligen können.

Zum Schluß möchten wir noch darauf hinweisen, daß in den wässerigen Lösungen von Brenztraubensäure und Oxalessigsäure nach den neuen Feststellungen von K. H. Meyer[2]) über die Konfiguration dieser Verbindungen die wahren Ketosäuren und nicht isomere Enolformen anzunehmen sind.

---

[1]) F. Ehrlich, diese Zeitschr. 2, 69, 1907.

[2]) K. H. Meyer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 45, 2852 u. 2861, 1912.

Über zuckerfreie Hefegärungen. X.

Die Gärung der α-Ketobuttersäure.

Von

C. Neuberg und J. Kerb.

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

Der Chemismus der zuckerfreien Gärung ist bisher bei den beiden Ketosäuren Brenztraubensäure und Oxalessigsäure aufgeklärt worden.

Während die Brenztraubensäure als eine Zwischenstufe bei der alkoholischen Gärung aufgefaßt werden muß, ist ein einfacher Zusammenhang der Oxalessigsäure mit den Zerfallsprodukten der Hexosen nicht ersichtlich.

Nun steht die Oxalessigsäure aber der Brenztraubensäure insofern nahe, als erstere selbst oder in Form von Derivaten bei einer Anzahl von Reaktionen in letztere übergehen[1]) kann:

$$COOH.CH_2.CO.COOH = CO_2 + CH_3.CO.COOH.$$

So wäre es immerhin möglich, die Gärung der Oxalessigsäure in letzter Linie auf die Vergärung der Brenztraubensäure durch das Enzym Carboxylase zurückzuführen. Eine solche Auffassung ist nun nicht mehr denkbar für eine Säure, die nicht einfach in Brenztraubensäure überzugehen vermag.

Daher untersuchten wir die α-Ketobuttersäure, $CH_3.CH_2.CO.COOH$, auf Gärfähigkeit.

---

[1]) Es ist natürlich auch denkbar, daß der bei der Vergärung von Oxalessigsäure auftretende Acetaldehyd aus Aldehydmalonsäure hervorgeht, d. h. daß Oxalessigsäure zunächst zum Halbaldehyd der Malonsäure vergoren wird, der dann in CO_2 und Acetaldehyd zerfällt:

$$COOH.CH_2.CO.COOH \longrightarrow COOH.CH_2.COH \longrightarrow CH_3.COH.$$

Zur Prüfung dieser Annahme werden wir auch Aldehydsäuren in den Kreis der Versuche über zuckerfreie Gärungen ziehen. Glyoxylsäure hat bisher ein negatives Resultat geliefert, die höheren Glieder der den Ketosäuren isomeren Aldehydsäuren sind noch nicht ausgeprobt.

Die α-Ketobuttersäure wird von Hefen und Hefenfermentpräparaten höchst energisch angegriffen.

Nach Vorversuchen mit Preßhefe des Handels verwendeten wir ausschließlich verschiedene Reinzuchthefen ober- und untergärigen Charakters.

Es waren die Hefen: G, M, U, UM, II und XII, die wir wiederum sämtlich dem Institut für Gärungsgewerbe in Berlin verdanken.

Davon sind M, II, XII obergärige, und G, U, UM untergärige Rassen.

Ein Blick auf die Tabelle S. 417 lehrt, daß die Bildung von CO_2 aus $1\,^0/_0$iger α-Ketobuttersäure durch lebende Hefen außerordentlich schnell und reichlich erfolgt, ebenso schnell[1]) wie in den Versuchen mit $1\,^0/_0$iger Traubenzuckerlösung, die zum Vergleich angestellt wurden.

Daß auch lebende Weinhefen die α-Ketobuttersäure mit besonderer Leichtigkeit angreifen, ist in der voraufgehenden Mitteilung[2]) angeführt.

Überall ist festgestellt worden, daß das entwickelte Gas reine Kohlensäure war.

Das gleiche günstige Ergebnis erzielt man mit Hefanol, mit Trockenhefe sowie mit Lebedew-Saft aus untergäriger Hefe (s. S. 418 und S. 419).

Bemerkenswerterweise erfolgt die Vergärung von α-Ketobuttersäure auch durch frische Hefe bei Gegenwart von Toluol (s. S. 419), das bekanntlich den Abbau von Glucose durch „lebende“ Hefe hindert.

Erheblich größere Schwierigkeiten als der Nachweis der Vergärung und des dabei entstandenen Kohlendioxyds bot die Erkennung der weiteren Produkte der Hefeneinwirkung. Wir haben vorläufig eines zu isolieren vermocht, und zwar den Propionaldehyd.

Derselbe geht aus der α-Ketobuttersäure wohl ganz analog hervor wie der Acetaldehyd aus Brenztraubensäure:

$$CH_3.CH_2.CO.COOH = CO_2 + CH_3.CH_2.COH.$$

---

[1]) Stellt man gleichzeitig je $1\,^0/_0$ige Lösungen von d-Glucose, Brenztraubensäure und Ketobuttersäure zur Gärung an, so beginnt die CO_2-Entwicklung am ersten zumeist bei der α-Ketobuttersäure. Später verwischt sich der Unterschied.

[2]) C. Neuberg und J. Kerb, diese Zeitschr. 47, 405, 1912.

Wir konnten den Propionaldehyd in Form seines p-Nitrophenylhydrazons vom Schmelzpunkt 124° abscheiden.

Allein die Menge des erhaltenen Propionaldehyds steht in keinem Verhältnis zu der überaus leichten Vergärbarkeit der α-Ketobuttersäure, so daß wir die Bildung noch anderer Produkte annehmen müssen. Wir denken vornehmlich an Propylalkohol und sind mit Versuchen zu seiner Isolierung beschäftigt.

Der Propionaldehyd kann qualitativ wie der Acetaldehyd durch die Reaktion von Rimini, d. h. mit Nitroprussidnatrium plus Diäthylamin, nachgewiesen werden. Die Blauviolettfärbung zeigt denselben Farbenton oder eine ungemein ähnliche Nuance wie bei der Acetaldehydprobe. Das gleiche Resultat ergab reiner Propionaldehyd von Kahlbaum, wie schon L. Lewin[1]) erwähnt.

Die Ausbeute an Propionaldehyd, die wir bei der Vergärung von α-Ketobuttersäure bisher erzielen konnten, war nur 4,2 % der Theorie. (Bei der Vergärung von Brenztraubensäure sind wir bis zu einer Ausbeute von 40 % der theoretisch möglichen Menge [s. S. 410] an Acetaldehyd gelangt.)

Welcher Art die anderen Umwandlungsprodukte der α-Ketobuttersäure auch sein mögen, ihr leichter Zerfall durch Einwirkung von Hefen ist sehr bemerkenswert. Der Umstand, daß Hefanol, Trockenhefe, ferner frische Hefen in Gegenwart von Toluol sowie der Lebedew-Saft ebenfalls Zerlegung veranlassen, stellt den enzymatischen Charakter der Reaktion sicher. Neben dem Nachweis einer wirklichen Spaltung von Ketobuttersäure und neben der Größenordnung der CO_2-Produktion tun die Versuche mit dem keine Selbstgärung zeigenden Lebedew-Saft dar, daß die Kohlensäurebildung nicht auf einer Stimulierung der Selbstgärung beruht. Auffallend ist die Resistenz der lebenden Hefe gegen eine so kräftige Säure wie die α-Ketobuttersäure. Letztere ist so stark, daß sie z. B. aus Silbernitrat Salpetersäure freimacht und gleichzeitig Silber-Ketobutyrat bildet (s. S. 417).

Wir können schon heute anführen, daß die noch stärkere α-Ketoglutarsäure, $COOH.CH_2.CH_2.CO.COOH$, die zur α-Ketobuttersäure im gleichen Verhältnis steht wie Oxalessig-

[1]) L. Lewin, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 32, 3389, 1899.

säure zu Brenztraubensäure, durch Hefe ebenfalls vergoren wird.

Ferner lassen Versuche von Fräulein Dr. E. Róna mit Phenylketobuttersäure (Benzylbrenztraubensäure), $C_6H_5.CH_2.CH_2.CO.COOH$, Anzeichen für Gärfähigkeit erkennen; hingegen wird eine geprüfte Diketosäure, die α, γ-Diketovaleriansäure (Acetonoxalsäure), $CH_3.CO.CH_2.CO.COOH$, von Hefen nicht angegriffen.

Während nun die α-Ketoglutarsäure mit der Glutaminsäure, während Brenztraubensäure und Oxalessigsäure mit zahlreichen stickstofffreien und N-haltigen Naturprodukten zusammenhängen, kann die α-Ketobuttersäure mit keinem entsprechenden Naturprodukt in Beziehung gesetzt werden. Denn die α-Amino-n-buttersäure, an die man denken könnte, ist bisher nicht unter den Bausteinen des Eiweißes gefunden. α-Oxybuttersäure kommt nicht in der Natur vor. Aller Voraussicht nach ist die α-Ketobuttersäure für die Hefen eine körperfremde[1]) Substanz. Von diesem Gesichtspunkte aus bietet ihre leichte Angreifbarkeit durch Hefencarboxylase ebenfalls Interesse.

Experimentelle und analytische Daten.

a) Darstellung von α-Ketobuttersäure.

Die Substanz wurde aus Methyloxalessigester nach den Angaben von A. Mebus[2]) und K. Kondo[3]) dargestellt.

---

[1]) Natürlich ist ein entfernterer Zusammenhang mit der Glutaminsäure über die Ketoglutarsäure möglich im Sinne des Schemas:

$$COOH.CH_2.CH_2.CO.COOH \longrightarrow CH_3.CH_2.CO.COOH,$$

ferner eine Beziehung zur Buttersäure, die im Organismus zu β-Oxybuttersäure wird. Durch weitere Oxydation der letzteren kann man sich α,β-Dioxybuttersäure entstanden denken, deren Anhydrid die α-Ketobuttersäure sein würde:

$$CH_3.CHOH.CHOH.COOH \longrightarrow CH_3.CH_2.CO.COOH.$$

Bemerkt sei auch, daß die Muskelextraktbase Carnitin nach E. Krimberg (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 3878, 1909) ein α-Oxybuttersäurederivat ist, und zwar Trimethyl-α-oxybutyrobetain. Über eine andere Beziehung der Buttersäure zur Glutaminsäure siehe W. Brasch und C. Neuberg, diese Zeitschr. 13, 299, 1908, sowie C. Neuberg, diese Zeitschr. 18, 431, 1909.

[2]) A. Mebus, Monatsh. f. Chem. 26, 483, 1905; Chem. Centralbl. 1905, I, 1590.

[3]) K. Kondo, diese Zeitschr. 38, 408, 1912.

Als ein Charakteristikum der α-Ketobuttersäure und zugleich als Beweis ihrer Stärke sei angeführt, daß die freie Säure beim Vermischen mit konzentrierter Silbernitratlösung alsbald eine dichte weiße Fällung von Silber-Ketobutyrat liefert. Das Salz bildet ein Haufwerk prismatischer, nicht sehr lichtempfindlicher Nadeln und ist nach dem Absaugen und Auswaschen mit eiskaltem Wasser analysenrein.

0,1020 g Substanz: 0,0525 g Ag.

$C_4H_5O_3$ Ag. Ber.: Ag = 51,67; gef.: Ag = 51,47 %.

b) Vergärung von α-Ketobuttersäure durch lebende Hefen.

Die α-Ketobuttersäure wurde stets als freie Säure, und zwar in 1 %iger wässeriger Lösung, angewandt. 12 ccm derselben wurden mit 1 bis 2 g der betreffenden Hefe im Reagensglase durchgeschüttelt und die Suspension in Schröttersche Gärröhrchen gefüllt. Die Resultate sind in folgender Übersichtstabelle vereint.

Hefe	Kohlendioxyd in ccm, entwickelt					
	aus 1 %iger α-Ketobuttersäurelösung nach		aus 1 %iger Glucoselösung nach		mit Wasser nach	
	4 Std.	23 Std.	4 Std.	23 Std.	4 Std.	23 Std.
G	8	10	8,5	10	0	1
M	10	—	10	—	0,5	—
U	10	—	10	—	0	—
U M	10	—	10	—	0,5	—
XII	7	8	10	10	0	0,3
II	10	—	10	—	0	—

Alle diese Versuche sind im Thermostaten bei 36° angestellt.

Wenn das Gärungsröhrchen nach 4 Stunden nicht ausgegoren war, d. h. sich noch nicht 10 ccm CO_2 gebildet hatten, so wurde der Versuch 23 Stunden fortgesetzt. Gleichzeitig wurde die Gärtüchtigkeit der Hefe mit 1 %iger Traubenzuckerlösung kontrolliert und der Betrag einer eventuellen Selbstgärung festgestellt. In allen Fällen wurde das entwickelte Gas untersucht. Es wurde bis auf einen verschwindenden Rest von KOH absorbiert; der nicht von Lauge verschluckte Anteil war eine Spur Luft, wie sie stets beim Stehen im Brutschrank von Hefen abgegeben wird.

Man sieht, daß die Gärung der α-Ketobuttersäure rasch vor sich geht und mit der von Traubenzucker fast vollständig gleichen Schritt hält.

c) Vergärung von α-Ketobuttersäure durch Hefemacerationssaft (Lebedew-Saft).

Es wurden 2 Versuchsreihen angesetzt. In der ersten (A) wurden gleiche Teile Macerationssaft und 1 %ige α-Ketobuttersäurelösung gemischt. In der zweiten (B) wurde die wasserfreie α-Ketobuttersäure direkt in den Lebedew-Saft eingetragen, so daß der Saft 1 Vol.-% freie Ketobuttersäure enthielt (99 ccm Saft, 1 ccm wasserfreie α-Ketobuttersäure).

Beide Versuchsreihen verhielten sich etwas verschieden.

Durch Verdünnung, wie sie bei A statthat, verliert Hefenmacerationssaft bekanntlich, ähnlich wie Hefepreßsaft, stark an Wirksamkeit. Die Hemmung des Gärvermögens macht sich in derselben Weise beim Vermischen mit der gleichen Menge 1 %iger α-Ketobuttersäurelösung wie 1 %iger Glucoselösung geltend. Macerationssaft, der mit der gleichen Quantität Leitungswasser gemischt ist, zeigt äußerlich keine Veränderung.

A.

	Kohlendioxyd in ccm, entwickelt aus gleichen Volumina von Hefemacerationssaft und von		
	1 %iger Ketobuttersäurelösung	1 %iger Traubenzuckerlösung	Wasser
Nach 1¼ Std.	Spur	Spur	0
„ 3 „	0,5	0,3	0
„ 20 „	2,0	1,5	0
„ 40 „	3,5	3,0	0

Löst man dagegen die α-Ketobuttersäure zu 1 % direkt in Macerationssaft, so bewirkt sie sofort eine starke Trübung infolge Fällung von Eiweißkörpern aus dem proteinreichen Saft. Füllt man die opake Flüssigkeit gleich in Gärröhrchen, so beobachtet man beim Stehen im Brutschrank (36°) eine völlige Gelatinierung. In dieser Periode wird während längerer Zeit kein Kohlendioxyd frei. Bei weiterem Verweilen im Thermostaten tritt wieder Verflüssigung ein, und unter Bildung eines flockigen Koagulums kommt es nun zu einer kräftigen Gasentwicklung (siehe B). Offenbar wird die Carboxylase zunächst

von den gelatinierenden Proteinen adsorbiert und erst allmählich bei der Verflüssigung wieder frei. Es ist überhaupt wunderbar, daß das Enzym diese Behandlung mit einer so starken eiweißfällenden Säure verträgt.

Im Kontrollversuch, wo der Hefemacerationssaft mit 1 %iger wasserfreier Essigsäure versetzt wurde, entstand gleichfalls ein Koagulum, aber keine CO_2-Entwicklung.

B.

	Kohlendioxyd in ccm, entwickelt aus Hefemacerationssaft	
	nach Zugabe von 1 Vol.-% α-Ketobuttersäure	nach Zugabe von 1 Vol.-% Eisessig
nach 5 Std.	0 (gelatiniert)	0 (Koagulum)
„ 20 „	10 (verflüssigt, feinflockiges Koagulum)	0 (Koagulum)

Es kann kein Zweifel sein, daß in beiden Versuchsreihen die α-Ketobuttersäure durch das im Hefemacerationssaft vorhandene Enzym angegriffen wird.

d) Vergärung von α-Ketobuttersäure durch Hefanol, durch Trockenhefe und durch frische Hefe unter Toluolzusatz.

Die Versuche, deren Ergebnis ohne weiteres aus der folgenden Tabelle zu ersehen ist, sind sämtlich mit 1 %iger α-Ketobuttersäurelösung in der Weise angesetzt, daß 12 ccm der Lösung mit 1,5 g des Hefenpräparates bis zur Bildung einer gleichmäßigen Suspension durchgeschüttelt wurden. Der Zusatz von Toluol betrug 0,6 ccm. Die erforderliche Gärdauer war kurz, die Temperatur war 36°.

Hefenpräparat	Kohlendioxyd in ccm, entwickelt			
	aus 1 %iger α-Ketobuttersäurelösung nach		mit H_2O nach	
	2 Std.	5 Std.	2 Std.	5 Std.
Hefanol	6	10	0	Luftbläschen
Hefanol + Toluol	6	10	0	„
Trockenhefe nach Lebedew . . .	10	—	0	—
Frische Hefe II + Toluol	10	—	0	—
Frische Hefe XII + Toluol . . .	10	—	0	—

Auch diese Versuche zeigen klar, daß die Vergärung der α-Ketobuttersäure ein enzymatischer Vorgang ist.

e) Nachweis von Propionaldehyd als Gärungsprodukt der α-Ketobuttersäure.

Destilliert man ausgegorene Ansätze von α-Ketobuttersäure zu etwa $^1/_3$ ab und rektifiziert das Destillat durch nochmalige Destillation über etwas Calciumcarbonat, so erhält man eine Flüssigkeit, die ammoniakalisch-alkalische Silberlösung reduziert; mit Nitroprussidnatrium plus Diäthylamin gibt sie eine Blauviolettfärbung, die auf Essigsäurezusatz in Blaugrün umschlägt. Allein die Reaktionen fallen bei weitem nicht so stark aus wie mit den Destillaten einer Brenztraubensäuregärung. Erst beim Ansatz einer größeren Quantität α-Ketobuttersäure mit viel Hefe ist uns die Isolierung eines neben Kohlendioxyd entstehenden Gärungsproduktes gelungen. Es erwies sich als Propionaldehyd.

6 g α-Ketobuttersäure wurden in 600 ccm Wasser gelöst und mit 130 g Hefe 5 Tage lang bei 28° in dem Apparat vergoren, welches in der voraufgehenden Mitteilung (S. 410) beschrieben worden ist.

Vom Gärgut wurden zunächst etwa 400 ccm abdestilliert, das Übergegangene durch erneute Destillation dann auf etwa 250 und diese auf 100 ccm gebracht. Nach Zugabe von 1 g p-Nitrophenylhydrazin, gelöst in 30%iger Essigsäure, entstand bald ein citronengelber Niederschlag. Derselbe wurde nach 24 Stunden abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und getrocknet. Die Menge belief sich auf 0,48 g. Der Schmelzpunkt lag nach einmaligem Umkrystallisieren aus heißem, verdünntem Alkohol bei 124°; den Schmelzpunkt des p-Nitrophenylhdrazons aus synthetischem Propionaldehyd gibt H. D. Dakin[1]) zu 123 bis 124° an.

0,1288 g Substanz gaben 0,2640 g CO_2 und 0,0665 g H_2O,
0,1218 g " " 22,6 ccm N (17,5°, 759 mm),
$C_9H_{11}N_3O_2$. Ber.: C = 55,96; H = 5,70; N = 21,71%;
gef.: C = 55,90; H = 5,75; N = 21,77%.

Damit ist das flüchtige und reduzierende Gärungsprodukt als Propionaldehyd gekennzeichnet.

[1]) H. D. Dakin, Journ. of Biolog. Chem. 4, 236, 1908.

Untersuchungen über die Wirkungsweise des Chinins.

Von

J. Moldovan (Wien).

(Aus dem Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten in Hamburg und dem Bakteriologischen Laboratorium des k. u. k. Militärsanitätskomitees in Wien.)

(Eingegangen am 18. November 1912.)

Die folgenden Untersuchungen wurden durch die Arbeit von Giemsa und v. Prowazek[1]) über die Wirkung des Chinins auf die Protistenzelle angeregt.

Die Ergebnisse dieser Autoren, durch v. Prowazek[2]) noch wesentlich ergänzt, lassen sich kurz wie folgt zusammenfassen: Auf Colpidien wirken stärkere Chininlösungen (1 : 8000) zunächst als Reiz und erhöhen die Lokomotion, töten aber später die Infusorien ab. Das Protoplasma der Zellen erfährt besonders in der präcytostomalen Region eine tropfige Entmischung, die später einer Verquellung und Aufblähung des Protistenleibes, die vermutlich mit einer Lipoidänderung verbunden ist, weicht. Der Kern wird vom Chinin später beeinflußt als das Protoplasma und erleidet eine globulitische Ausfällung. Die Tätigkeit der contractilen Vakuolen wird erniedrigt, und es scheint ihre plasmatische Niederschlagsmembran verfestigt zu werden. Die Nahrungsaufnahme wird nicht alteriert, dagegen die Defäkation, wohl infolge der veränderten Plasmaspannung, erhöht. Die Vermehrung der Colpidien wird bei entsprechender Konzentration des Chinins herabgesetzt. Colpidien, mit Methylenblau gefärbt, konnten in ihren präcytostomalen Partien, wo auf Grund anderer Versuche besonders lebhafte Reduktionen sich abzuspielen scheinen, unter Chinineinfluß nicht mehr alles Methylenblau reduzieren; es blieb dort in der Oxyform bestehen, als Ausdruck dafür, daß das Chinin das Sauerstoffbedürfnis der Zelle herabsetzt, also die Oxydationen vermindert. In gleichem Sinne spricht auch die Tatsache,

---

[1]) Giemsa und v. Prowazek, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhygiene, Beihefte 1908.

[2]) v. Prowazek, Einführung in die Physiologie der Einzelligen. Leipzig 1904.

daß Colpidien in einer Wasserstoffatmosphäre unter dem Einfluß von Chinin bedeutend rascher ersticken als in Kontrollproben, in denen entweder nur die Wasserstoffatmosphäre oder nur das Chinin zur Wirkung gelangt.

Die übrige Literatur über die Wirkungsweise des Chinins wird, soweit sie mit unseren Untersuchungen in Beziehung steht, später ausführliche Berücksichtigung finden.

Unseren Experimenten lagen folgende Fragestellungen zugrunde:

I. Verfolgung der Chininwirkung durch direkte Beobachtung an Colpidien, Trypanosomen, Malariaparasiten und Pflanzenzellen.

II. Prüfung der Wirkungsintensität anderer Agenzien allein und in Kombination mit Chinin an Colpidien.

III. Verhalten der Sauerstoffatmung unter dem Einflusse von Chinin, untersucht an Colpidien, Pflanzenzellen, Meerschweinchen und Kaninchen.

Als Nebenprodukt dieser Untersuchungen ergaben sich einige biologisch interessante Details, die, ohne auf die Frage nach dem Wesen der Chininwirkung direkt Bezug zu haben, auch kurze Erwähnung finden werden.

I.

Die verwendeten Colpidien (Colpidium colpoda Ehrbg.) stammten aus einem Heuinfus, in dem sie ohne Beimengung anderer Infusorien vorhanden waren. Sie wurden vor dem Gebrauch stets abzentrifugiert und dann in reinem Leitungswasser suspendiert. Das Chinin kam stets als salzsaures Salz, für diese Experimente in Leitungswasser gelöst, zur Verwendung.

Bringt man zu 1 Tropfen Colpidiensuspension 1 Tropfen Chininlösung (1 : 1000), mischt gut durch und beobachtet das Präparat mikroskopisch, so sieht man zunächst Beweglichkeit, Form und Struktur der Infusorien unverändert bleiben. Dann treten in der präcytostomalen Partie, später auch im übrigen Protoplasmaleib stark lichtbrechende Tröpfchen auf, die an Größe zunehmen, der Protistenleib wird rund, vacuolisiert und aufgebläht, die Beweglichkeit nimmt progressiv ab, nach einem kurzen Stadium der Rotation um die eigene Achse werden die Zellen unbeweglich und sterben ab. Läßt man gleichzeitig

mit dem Chinin sehr schwache, an sich indifferente Methylenblaulösungen einwirken, so lassen sich in den Endstadien der Chininwirkung netzförmige Fällungen im Protoplasma und globulitische Ausfällung des Kernes deutlich machen [Giemsa und v. Prowazek[1])].

Um über die Natur der unter Einfluß des Chinins auftretenden stark lichtbrechenden Tröpfchen, die von v. Prowazek als lipoidartig angesprochen wurden, Aufschluß zu erhalten, brachten wir die bereits entmischten Protozoen in eine wässerige Lösung von Sudan III. Nach kurzer Zeit hatten jene Tröpfchen eine deutlich rötliche Farbe angenommen. Einwirkung schwacher Osmiumsäure bräunt die Gebilde, Neutralrot färbt sie rot, Indophenolblau tief blau. Durch all dieses wird die Annahme unterstützt, daß jene bei der Einwirkung des Chinins auf Colpidien auftretenden stark lichtbrechenden Tröpfchen tatsächlich lipoidartiger Natur sind.

Die einzelnen Phasen der Chininwirkung auf Colpidien sind demnach, soweit sie sich durch direkte Beobachtung ermitteln lassen, folgende: Zustandsänderungen im Protoplasma, gefolgt von Entmischung desselben, Störung der osmotischen Relation zu der Umgebung (Vacuolenbildung und Aufblähung), Schädigung des Kernes, Sistierung der Beweglichkeit und Zelltod. Die späte Alteration der Beweglichkeit, selbst nach dem Schwinden der Reaktion auf intensive äußere Reize, wird durch folgenden Versuch bewiesen: Setzt man eine Colpidiensuspension auf einem entsprechend konstruierten Objektträger einem konstanten elektrischen Strom aus, so kann man unter dem Mikroskop leicht die Wanderung der Infusorien zur Kathode beobachten. Bringt man nun zu der Suspension Chinin hinzu, so wird zunächst der richtende Einfluß des Stromes gar nicht geändert; nach einer gewissen Zeit jedoch hört die galvanotaktische Reaktion auf, obwohl die Infusorien noch gut beweglich sind. Auch beim Einschalten stärkerer Ströme und bei wiederholter Änderung der Stromrichtung setzen die Colpidien ihre gewöhnlichen, ungeordneten Bewegungen fort, um dann bald abzusterben. Diese Erscheinung ist stets nur kurz vor dem Absterben der Zellen zu beobachten. Der Effekt ist ganz unabhängig von der Kon-

[1]) l. c.

zentration des Chinins, so daß es sich nicht um eine einfache Entladung der Colpidien handeln kann. Ob man nun Chinin 1:500 oder 1:10000 verwendet, jenes Phänomen tritt unabhängig davon auf und stets nur im präagonalen Stadium der Chininwirkung.

Für unsere Trypanosomenversuche [s. auch Anschütz[1])] verwendeten wir ein Mal den Caderasstamm. Mit frischem trypanosomenhaltigen Blut intraperitoneal geimpfte Ratten erlagen der Infektion in 2 bis 3 Tagen. Um Versuchsmaterial zu erhalten, wurden infizierte Ratten im Endstadium der Krankheit entblutet, das Blut in der 4 bis 5 fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung aufgefangen und zentrifugiert. Hierbei kamen die spezifisch leichteren Parasiten auf das Blutkörperchensediment zu liegen; sie wurden abgehoben und in Kochsalzlösung dicht aufgeschwemmt.

Chinin 1:500 (in Kochsalzlösung) vermag die Trypanosomen schon nach 10 Minuten zu immobilisieren, bei 1000facher Verdünnung nach 15, bei 1:2000 nach 18 bis 20 Minuten. Die Konzentration von 1:4000 hat nur eine kurzdauernde Beweglichkeitsabnahme zur Folge. Beobachtet man nun den Effekt einer Chininlösung 1:1000 mikroskopisch, so ist während der ersten 5 Minuten eine Änderung der Form und Beweglichkeit der Parasiten nicht wahrzunehmen. Dann nimmt die Beweglichkeit progressiv ab, der Zelleib wird starrer, zunächst im ganzen dicker, dann lassen sich besonders in der Nähe des Blepharoplasts und des Kernes Vacuolen feststellen, die, an Größe zunehmend, zu einer kugeligen Auftreibung des Zellleibes führen können. Diese Entrundung muß jedoch nicht immer die Folge einer hochgradigen Vacuolenbildung sein, sie kann auch durch einfache Aufquellung des Zelleibes bedingt werden. In weiterer Folge kann es zum Platzen der Periplasthülle mit Eventration des Zellinhaltes kommen. Der Blepharoplast bleibt samt Geißel und undulierender Membran stets mit der Periplasthülle in Verbindung. Oft sind schon kurz nach Beginn der Chininwirkung kleinste, stark lichtbrechende Kügelchen im Protoplasma verstreut zu beobachten, die den Eindruck von Lipoidtröpfchen machen, wegen ihrer Kleinheit jedoch nicht

---

[1]) Anschütz, Centralbl. f. Bakt. I, Orig.-Bd. 54, 1910.

als solche identifiziert werden konnten. Auch die Trypanosomen können noch bei weitgehender Veränderung des Protoplasmas beweglich sein; selbst bei bis zur Kugelbildung aufgeblähten Parasiten ist noch ein Fortschlagen der undulierenden Membran und der Geißel bemerkbar.

Setzt man der gleichen Chininlösung Spuren von Methylenblau zu, so bleiben die zunächst lebhaft beweglichen Trypanosomen vollkommen ungefärbt. Dann treten an einzelnen Stellen des Protoplasmas flockige Fällungszeichnungen von bläulicher Farbe auf, Kern und Blepharoplast färben sich in ihren zentralen Partien leicht blau.

Entnimmt man einer Chinintrypanosomenmischung in Intervallen von 2 zu 2 Minuten Proben und färbt sie nach Alkohol- oder Sublimatalkoholfixierung nach Giemsa, so erscheinen die Parasiten innerhalb der ersten 5 Minuten gegenüber Kontrollpräparaten unverändert. Dann aber läßt die Färbbarkeit des Protoplasmas nach, es treten netzförmige Zeichnungen in demselben auf, die Blähung und Vacuolisierung des Zelleibes wird deutlich. Nach 10 Minuten sind auch schon die ersten Veränderungen am Kern wahrnehmbar, er ist aufgelockert, macht einen „hypertrophischen“ Eindruck, oder er ist fragmentiert. Dieselben Veränderungen sind gleichzeitig oder erst später (12 bis 14 Minuten) am Blepharoplasten zu sehen.

Das Chinin vermag demnach bei Trypanosomen annähernd dieselben Veränderungen in der gleichen zeitlichen Reihenfolge wie bei Colpidien hervorzurufen: Entmischung und Vacuolisierung des Protoplasmas, dann Schädigung des Kernes und des lokomotorischen Apparates und schließlich Zelltod. Eine Differenz ist jedoch auffällig. Während bei Colpidien die tropfige Entmischung in den Vordergrund tritt und zu einer Erfüllung des ganzen Protoplasmas mit lipoidartigen Tröpfchen führen kann, ist bei Trypanosomen, als Ausdruck osmotischer Störungen, die Vacuolisierung und Quellung des Protoplasmas besonders ausgesprochen, während Lipoidtröpfchen nur in spärlicher Zahl auftreten. Der Lipoidgehalt jener Zellarten ist eben ein ganz verschiedener, und darauf mag es auch zurückzuführen sein, daß die Trypanosomen dem Chinin gegenüber bedeutend resistenter sind als die Colpidien, und daß letztere, wie sich mittels der Thalleiochinreaktion nachweisen läßt, das Alkaloid

sehr wohl zu speichern vermögen, während das bei Trypanosomen nie der Fall ist.

Diese Reaktion wird bekanntlich in der Weise durchgeführt, daß man zu der zu prüfenden Lösung frisch bereitetes Bromwasser bis zur schwach gelben Färbung zufügt und dann wässerige Ammoniaklösung zusetzt. Bei Gegenwart von Chinin färbt sich die Flüssigkeit schön smaragdgrün. Die Empfindlichkeitsgrenze dieser Reaktion liegt bei einer Verdünnung des Chinins 1 : 7500 [Giemsa und Schaumann[1])]. Wir suspendierten nun sorgfältig gewaschene Colpidien in einer Chininlösung 1 : 10 000 und stellten nach dem Absterben der Infusorien die Thalleiochinreaktion an. Nach 10 Minuten wurde zentrifugiert und nun zeigte das Sediment eine schwache, jedoch deutliche Grünfärbung, während die überstehende Flüssigkeit vollkommen farblos erschien. Die Differenz in der Färbung des Colpidiensedimentes und der überstehenden Flüssigkeit wird bei Verwendung konzentrierterer Chininlösungen noch deutlicher.

Für unsere Versuche an Pflanzenzellen wählten wir die Blätter von Elodea canadensis. Die Versuche von v. Eisler und v. Portheim[2]) über die Beeinflussung der Giftwirkung des Chinins durch Salze zeigten, daß sich in dem Verhalten der Protoplasmaströmung in den Zellen der losgelösten Blätter sehr deutlich der Grad der Giftwirkung widerspiegelt. Die sorgfältig losgelösten Blätter müssen zunächst einige Minuten in Leitungswasser verweilen, um die durch den Chok des Abreißens sistierte Plasmaströmung wieder auftreten zu lassen; dieselbe bleibt dann in Wasser oder Kochsalzlösung durch viele Stunden ungeschwächt bestehen. Bringt man jedoch die Blätter in eine Chininlösung 1 : 100, so tritt bald eine Verlangsamung der Strömung auf; nach 5 Minuten ist sie nunmehr in einzelnen Zellen der Mittelrippe wahrnehmbar. Dann treten im Zellsaft und im Protoplasma feinste, lebhaft tanzende Körnchen auf, dazwischen jedoch im Protoplasma kleine, stark lichtbrechende Tröpfchen, die, an Größe und Zahl zunehmend, bald die ganze Masse des Protoplasmas erfüllen können. Sie erscheinen zunächst ungefärbt, nehmen dann den aus den agglomerierten Chlorophyllkörnern diffundierten Farbstoff auf und erscheinen leicht grünlichgelb tingiert. Mikrochemische Reaktionen ergaben, daß jene lebhaft tanzenden Körnchen Gerbsäureniederschlägen entsprechen, während die stark lichtbrechen-

[1]) Giemsa und Schaumann, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhygiene, Beihefte 1907.

[2]) v. Eisler und v. Portheim, diese Zeitschr. 21, 1909.

den Tröpfchen neben Gerbsäure und Eiweiß vorwiegend fettartige Substanzen enthalten. Ob diese Tropfen den „Proteosomen" Loews resp. jenen „myelinartigen" Gerbsäureniederschlägen, die in lebenden Pflanzenzellen nach Einwirkung verschiedener Alkaloide auftreten [s. Czapek[1])], vollkommen entsprechen, haben wir nicht geprüft.

Weniger erfolgreich waren die Versuche mit Malariaparasiten. Blut von hochgradig mit Plasmodium präcox infizierten Kanarienvögeln wurde in Kochsalzlösung aufgefangen und zentrifugiert. Das Sediment wurde mit Chininlösungen verschiedener Konzentration zusammengebracht. Es ist bekannt [v. Wasielewski[2]), Koponaris[3])], daß diese Parasiten durch Chinin 1:1000 bis 1:1500 innerhalb 20 Minuten in vitro abgetötet werden. Bei Verwendung dieser Konzentration konnten wir auch nach 40 Minuten langer Einwirkung weder im Nativpräparat noch in Giemsapräparaten irgendeinen abweichenden Befund in Form, Struktur und Färbbarkeit der Plasmodien nachweisen. Wirkte Chinin 1:100 durch 20 Minuten auf die infizierten Blutkörperchen ein, so ließ sich im Giemsapräparat wohl eine Abrundung des Parasitenleibes, verschwommener Kontur, schwächere Färbbarkeit des Protoplasmas und Auflockerung der Kernsubstanz wahrnehmen, ohne daß jedoch diese Veränderungen besonders stark ausgesprochen gewesen wären. Sogenannte zerrissene Formen konnten wir nicht auffinden. Dasselbe Resultat ergab die Untersuchung des Blutes von malariakranken Menschen (Tertiana- und Tropikainfektionen); allerdings war hier der Parasitengehalt der Proben ein sehr geringer und konnten gerade jene Entwicklungsstadien der Tertiana, an denen der Effekt am besten hätte studiert werden können (halberwachsene Parasiten), nicht beobachtet werden.

Abgesehen von diesen Parasiten haben wir also bei Infusorien, Trypanosomen und Pflanzenzellen Veränderungen unter dem Einfluß des Chinins wahrgenommen, die trotz des differenten Untersuchungsmateriales prinzipiell gleichartig auftraten und auf einen einheitlichen Wirkungsmechanismus schließen lassen. Als erster Effekt ist stets die Zustandsänderung des

---

[1]) Czapek, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 1910, H. 5.

[2]) v. Wasielewski, Studien über pathog. Protozoen, H. 2, 1908.

[3]) Koponaris, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhygiene 15.

Protoplasmas und der Plasmahaut erkennbar, gefolgt von tropfiger Entmischung der Plasmakolloide und Störung der osmotischen Relation zu der Umgebung; dann erst wird der Kern- und lokomotorische Apparat affiziert.

Hier mag eine Beobachtung eingefügt werden, die wir bei allen Versuchen mit Colpidien und Trypanosomen machen konnten; es ist die auffällige Differenz in der Widerstandsfähigkeit der Einzelindividuen gegenüber Chinin, die auch durch Giemsa und v. Prowazek[1]) hervorgehoben wurde. Bringt man eine wirksame Chininlösung zu einer Colpidien- oder Trypanosomensuspension, so werden nicht alle Zellen gleichzeitig abgetötet. Die Absterbeordnung erfolgt in einer Art, wie sie sich, wenigstens zum Teil, durch eine Exponentialkurve darstellen ließe, das Gros der Individuen stirbt innerhalb eines engbegrenzten Intervalles ab, ein Teil jedoch weicht nach der positiven und negativen Seite mehr oder weniger stark ab. Ob hier eine Analogie mit den von Reichenbach[2]) bezüglich der Resistenz von Bakterien chemischen Agenzien gegenüber erzielten Resultaten statthaft ist und ob sich durch das Studium der Resistenzfrage an Colpidien Anhaltspunkte für eine generelle Beurteilung dieser wichtigen Frage gewinnen lassen werden, müssen weitere Untersuchungen lehren. Wir glauben jedoch nach einzelnen Experimenten, die später ergänzt und ausführlich mitgeteilt werden sollen, zu dem Schlusse berechtigt zu sein, daß die Intensität des Stoffwechsels der Einzelindividuen für ihre Resistenz ausschlaggebend ist [v. Prowazek[3])] in dem Sinne, daß junge Zellen gegen hohe Chinindosen empfindlicher sind als ältere. Auch solche Zellen, in denen durch bestimmte Agenzien der Stoffwechsel künstlich gesteigert wurde, verhielten sich ähnlich wie junge Zellen (s. später). Auch haben wir Befunde erhoben, die die Absterbeordnung nicht allein auf die verschiedene Resistenz der Zellen basieren, sondern auch von der Natur des einwirkenden Agens abhängig erscheinen lassen. Bringt man aus ein und derselben Colpidiensuspension eine Probe mit Chinin und eine zweite mit Saponin zusammen, so kann die „Absterbeordnung“ in denselben ganz verschieden

[1]) l. c.
[2]) Reichenbach, Zeitschr. f. Hyg. 69, 1910.
[3]) l. c.

verlaufen, und zwar in der Chininprobe so, wie oben skizziert, in der Saponinprobe kann jedoch die eine Hälfte der Infusorien bald und annähernd gleichzeitig absterben, während die zweite Hälfte überhaupt überlebt. Welche Momente für dieses auffällige Verhalten verantwortlich zu machen sind, sind wir eben im Begriffe zu untersuchen und hoffen, darüber bald Näheres berichten zu können.

II.

v. Prowazek[1]) hatte festgestellt, daß Säuren die Colpidien gegen die Einwirkung des Chinins resistenter machen, während Alkalien, Saponin, Äther, Benzol, Rohrzucker ihre Empfindlichkeit steigern. Die Alkalien und die lipoidlöslichen Mittel erniedrigen die innere Strukturspannung der Zelle, befördern also die Entmischung des Protoplasmas durch das Chinin, während Säuren antagonistisch wirken. Der Einfluß von Salzen auf die Giftwirkung des Chinins ist durch v. Eisler und v. Portheim[2]) an Pflanzenzellen, durch Brailsford Robertson[3]) an Infusorien studiert worden. Uns schwebte das Ziel vor, ein die Chininwirkung möglichst intensiv verstärkendes Agens zu finden, um dann durch kombinierte Wirkung Heilversuche an Trypanosomeninfektionen durchzuführen. Wie gleich vorweggenommen sein mag, haben wir dieses Ziel noch nicht erreicht. Immerhin scheint uns die Wiedergabe der Versuche über den Einfluß verschiedener Agenzien auf die Chininwirkung von Interesse zu sein.

Alle unsere Experimente wurden an Colpidien aus ein und derselben Kultur durchgeführt. Colpidien aus verschiedenen Infusen zeigen manchmal weitgehende Differenzen in der Resistenz gegenüber den verwendeten Giften. Auch wurden die Infusorien vor dem Versuch stets abzentrifugiert, einmal mit Leitungswasser gewaschen und dann bis zur Dichte der ursprünglichen Kultur in Leitungswasser suspendiert. Das Waschen der Infusorien, d. i. die gründliche Entfernung des ursprünglichen Suspensionsmediums, ist unbedingt erforderlich, da letzteres durch seine wechselnde Reaktion und durch die verschiedenen in ihm gelösten Stoffe die Wirkung der einzelnen

---

[1]) l. c.

[2]) l. c.

[3]) Brailsford Robertson, Journ. of med. Chem. 1.

Agenzien in nicht kontrollierbarer Weise beeinflussen kann. Die Dichte der Colpidiensuspension ist für den Ausfall des Versuches auch von Bedeutung, sie soll für Vergleichversuche annähernd dieselbe sein [v. Prowazek[1])].

Die Experimente wurden in der Weise durchgeführt, daß zunächst die einzelnen Agenzien — parallel mit dem Chinin — an Colpidien bezüglich ihrer Giftwirkung ausgewertet wurden. Dann wurde Chinin mit den einzelnen Mitteln kombiniert zur Wirkung gebracht, und zwar entweder gleichzeitig im Mischversuch oder aber es wurden die Colpidien zunächst mit dem einen Mittel vorbehandelt, abzentrifugiert und dann in frischem Leitungswasser suspendiert, sofort der Chininwirkung ausgesetzt. Die Vorbehandlung geschah nur so lange, daß Schädigungen der Infusorien nicht wahrzunehmen waren, das Abzentrifugieren und Zufügen des Chinins so rasch, daß ein vorzeitiges Herausdiffundieren des ersten Mittels aus den Colpidien nicht möglich war. Zur Verwendung kamen neben dem Chinin Saponin, Atropin, Strychnin, Curare, Galle, taurocholsaures Natrium, Methylenblau, Neutralrot und Trypanrot.

Die Kombination Chinin-Saponin führte zu folgendem Resultat.

Auswertung.

	Chinin				Saponin			
	1 : 1000	1 : 10000	1 : 30000	1 : 60000	1 : 500	1 : 1000	1 : 2000	1 : 10000
Tod in Min.	5	30	45	60	5	10 z. T.	15 z. T.	—

Mischversuch.

Einwirkungsdauer	Chinin 1 : 10000	Chinin + Saponin je 1 : 10000	Saponin 1 : 10000
5′	lebhaft beweglich	z. T. tot	lebhaft beweglich
10′	entrundet beweglich	tot	„
20′	z. T. tot		„
30′	tot		„
45′			beweglich
60′			„
2h			„

Es resultiert demnach bei Kombination des Chinins mit einer an sich nahezu unwirksamen Saponinkonzentration eine

[1]) v. Prowazek, Centralbl. f. Bakt. I, Orig.-Bd. 66, 1912.

bedeutende Verstärkung der Wirkung. Auch bei Verwendung höherer Saponinkonzentrationen ging die Wirkung weit über den Summationseffekt der Einzelkomponenten hinaus.

Nun wurden Colpidien mit Saponin vorbehandelt und dann verschiedenen Chininkonzentrationen ausgesetzt. Als Kontrollen dienten mit Saponin nicht vorbehandelte, jedoch gleichfalls zentrifugierte Infusorien, mit den gleichen Lösungen des Chinins zusammengebracht. Die Vorbehandlung erfolgte mit Saponin 1 : 1000 durch 5 Minuten.

Wirkungsdauer des Chinins	Nachbehandelt mit Chinin					
	1 : 10000		1 : 30000		1 : 60000	
	Saponinprobe	Kontrolle	Saponinprobe	Kontrolle	Saponinprobe	Kontrolle
5′	z. gr. T. tot	lebh. bew.	lebhaft bewegl.	lebhaft bewegl.	lebh. bewegl.	lebh. bewegl.
10′	tot	beweglich	beweglich	„	„	„
15′		entr. bew.	„	beweglich	beweglich	beweglich
20′		z. T. tot	entr. z. gr. T. tot	z. T. tot	„	„
30′		tot	tot	entr. z. gr. T. tot	entr. z. T. tot	entr. z. T. tot
45′				tot	tot	z. gr. T. tot
60′						tot

lebh. bew. = lebhaft beweglich; bew. = beweglich; entr. = entrundet; z. T. = zum Teil; z. gr. T. = zum größten Teil.

Bei Vorbehandlung mit Saponin 1 : 1000 tritt demnach durchweg eine Verstärkung der Chininwirkung zutage, am meisten ausgesprochen bei der stärksten Chininkonzentration 1 : 10000, weniger bei 1 : 30000, am schwächsten bei 1 : 60000.

Vorbehandlung mit Saponin 1 : 20000 durch 15 Minuten.

Wirkungsdauer des Chinins	Nachbehandelt mit Chinin					
	1 : 10000		1 : 30000		1 : 60000	
	Saponinprobe	Kontrolle	Saponinprobe	Kontrolle	Saponinprobe	Kontrolle
5′	beweglich	lebh. bew.	lebhaft bewegl.	lebh. bewegl.	lebhaft bewegl.	lebh. bewegl.
10′	tot	beweglich	beweglich	„	beweglich	„
15′		entr. bew.	„	beweglich	„	beweglich
20′		z. T. tot	entr. z. gr. T. tot	entr. z. T. tot	„	„
30′		tot	„	z. gr. T. tot	entr. z. T. tot	entr. z. T. tot
45′			tot	tot	„	z. gr. T. tot
60′					„	tot
2h					„	
24h					„ [1]	

Bei Vorbehandlung mit Saponin 1 : 20000, also einer viel schwächeren Konzentration als im früheren Versuch, resultiert

[1]) Nach 24h z. T. noch gut beweglich.

demnach eine Verstärkung der Wirkung des Chinins 1 : 10000 und eine bedeutende Abschwächung des Effektes von Chinin 1 : 60000, während bei einer mittleren Konzentration des Alkaloids (1 : 30000) eine Abweichung von der Kontrolle überhaupt nicht wahrzunehmen ist.

Im Prinzip dieselben Resultate erzielten wir bei Umkehrung der Versuche, d. i. Vorbehandlung mit Chinin und Nachwirkung von Saponin. Vorbehandlung mit starken Chininlösungen (z. B. 1 : 10000) hatte durchweg eine Verstärkung der Wirkung des Saponins zur Folge, unabhängig von der Konzentration des letzteren. Vorbehandlung mit schwachen Chininlösungen (1 : 100000 durch 30 Minuten) hatte zur Folge, daß die Infusorien starken Saponinlösungen (1 : 500) rascher erlagen, schwachen gegenüber jedoch sich resistenter zeigten, als in den entsprechenden Kontrollpräparaten.

Bevor wir eine Erklärung dieser Ergebnisse versuchen, sollen noch einige Experimente mit der Kombination Chinin-Methylenblau kurz wiedergegeben werden.

Die Auswertung des Methylenblaus ergab, daß es in der Verdünnung von 1 : 2000 unsere Colpidien innerhalb 30 Minuten abtötete, während 1 : 20000 überhaupt keinen nennenswerten Einfluß auf die Zellen auszuüben vermochte. Es wurden nun gleiche Proben einer Colpidiensuspension mit fallenden Konzentrationen Methylenblau durch 1 Stunde vorbehandelt und dann gleichartig einer Chininlösung 1 : 20000 ausgesetzt.

Wirkungsdauer des Chinins	Vorbehandlung mit Methylenblau					Chininkontrolle
	1 : 10000	1 : 50000	1 : 200000	1 : 2000000	1 : 20000000	1 : 20000
5′	tot	tot	gr. T. tot	beweglich	beweglich	beweglich
10′			"	"	"	"
15′			"	"	"	"
20′			tot	entr. bew.	entr. bew.	entr. bew.
30′				"	"	z. T. tot
45′				z. T. tot	z. T. tot	tot
60′				"	"	
2^h				"	"	

Auch hier also das Resultat, daß Vorbehandlung mit stärkeren Methylenblaulösungen die Wirkung des Chinins 1 : 20000 wesentlich verstärkt, während Spuren des ersten Mittels den Effekt bedeutend abschwächen. Letzteres tritt noch deutlicher

in folgendem Versuche hervor, der von dem früheren dadurch abweicht, daß eine bedeutend dichtere Colpidiensuspension zur Verwendung kam.

Vorbehandlung mit verschiedenen Methylenblaukonzentrationen durch 1 Stunde; darauf Chinin 1 : 20000.

Wirkungsdauer des Chinins	Vorbehandlung mit Methylenblau				Chinin-Kontrolle
	1 : 20000	1 : 200000	1 : 2000000	1 : 20000000	1 : 20000
1^h	tot	beweglich	lebh. bew.	lebh. bew.	gr. T. tot
2^h		entr. bew.	„	„	tot
24^h		tot	„	„	
48^h			„	„	
72^h			lebh. bew.	lebh. bew.	

Die Vorbehandlung der Colpidien mit Methylenblau 1 : 20 000 000 hatte den Effekt, daß nachträglich zugefügtes Chinin 1 : 20000 völlig wirkungslos blieb.

Im Prinzip dieselben Resultate, wie oben skizziert, wurden bei der Kombination des Chinins mit Atropin, Neutralrot, Strychnin, Curare, Galle und taurocholsaures Natrium erzielt. Trypanrot, das selbst in der Konzentration 1 : 100 die Colpidien nicht zu schädigen vermag, läßt nur einen schützenden, die Chininwirkung beeinträchtigenden Effekt erkennen.

Wir sehen aus diesen Versuchsreihen, besonders aber aus den Experimenten mit Chinin-Saponin und Chinin-Methylenblau, daß bei kombinierter Aktion zweier Mittel auf Colpidien der Gesamteffekt nicht nur von der Natur der Komponenten abhängig ist, in dem Sinne, daß bei der einen Kombination nur eine Verstärkung der Einzeleffekte, bei einer zweiten nur eine gegenseitige Abschwächung resultiert. Es ist für den erzielten Effekt auch die Konzentration der einzelnen Agenzien insofern ausschlaggebend, als man durch Variation der Konzentration des einen Mittels die Wirkung des zweiten beliebig verstärken, abschwächen oder unbeeinflußt lassen kann.

René Sand[1]) hat beobachtet, daß Chinin und Arsenik, die in höheren Konzentrationen bestimmte Infusorien (Stylonychia pulstulata) rasch abtöten, in starken Verdünnungen (1 : 500000) nicht einfach wirkungslos bleiben, sondern die Vitalität der Zellen steigern. Diese Steigerung der „Vitalität“, wohl als

[1]) René Sand, Act. thérapeutique de l'arsenic etc. Bruxelles 1901.

Steigerung des Stoffwechsels aufzufassen, kommt in einer bedeutenden Beschleunigung der Teilung deutlich zum Ausdruck. Es ist das vielleicht nur ein Spezialfall des Gesetzes, daß Paralysatoren in kleinsten Mengen zu Aktivatoren werden, d. h. daß Agenzien, die die Wirkung von Fermenten lahmlegen, in schwächsten Konzentrationen die Tätigkeit derselben Fermente erheblich fördern können. Übertragen wir diese Erkenntnis auf unsere Befunde, so können wir sagen, daß das Saponin 1 : 20000 oder Methylenblau 1 : 20000000 vielleicht deshalb eine schützende Wirkung vor dem nachträglich zugefügten Chinin ausgeübt hat, weil dadurch die Vitalität, die Stoffwechselintensität der Zellen eine Steigerung erfahren hatte. Vorbehandlung mit hohen Dosen jener Mittel schädigt die Colpidien, die dann rascher der Chininwirkung erliegen, mittlere Dosen lassen den Stoffwechsel der Zelle unbeeinflußt, die Chininwirkung kommt rein zur Geltung. Jene künstliche Stoffwechselsteigerung bedingt jedoch nicht einfach eine Erhöhung der Resistenz überhaupt, sie bedingt nur, daß die Zelle schwache Schädigungen leichter überwindet, stärkeren Giftwirkungen jedoch erliegt sie rascher, denn die Vorbehandlung mit Saponin 1:20000 beeinträchtigte nur die Wirkung schwacher Chininkonzentrationen (1 : 60000), während die Wirkung höherer Chininkonzentrationen (1 : 10 000) trotz derselben Vorbehandlung verstärkt wurde. Es bedarf wohl noch weiterer Studien, um alle hier in Betracht kommenden Momente aufzuklären und um die wichtige Frage zu entscheiden, ob auch in einem Zustande physiologisch erhöhten Stoffwechsels dasselbe Verhalten der Resistenz die Regel ist. Einzelne diesbezügliche Versuche haben uns gezeigt, daß tatsächlich die Zellen einer jungen (eintägigen) Colpidienkultur („Einzelkultur“) höheren Chininkonzentrationen (1 : 10000) gegenüber weniger resistent sind, als Infusorien aus derselben Kultur aus späteren Tagen, sie erliegen auch annähernd gleichzeitig der Giftwirkung, so daß erhebliche Resistenzunterschiede der Einzelindividuen nicht wahrzunehmen sind. Mit fortschreitenden Alter der Kultur — bis zu einer gewissen Grenze — wird die Resistenzbreite größer und auch die Gesamtresistenz im allgemeinen höher. Es sprechen diese Versuche zugunsten der Anschauung, daß der Stoffwechselzustand der Colpidien für ihre Resistenz entscheidend ist

(v. Prowazek). Ob sich daraus auch eine Bestätigung der Reichenbachschen Anschauung von der ausschließlichen Bedeutung des verschiedenen Generationsalters der eine Kultur zusammensetzenden Bakterien für die Absterbeordnung derselben entnehmen läßt, müssen erst weitere Versuche lehren.

Unsere Versuchsergebnisse sprechen jedoch sicherlich nicht zugunsten der Theorie Bürgis[1]) über die Wirkungsweise von Arzneimittelkombinationen, die besagt, daß Kombinationen von im großen und ganzen gleichartig wirkenden Arzneien zu einer glatten Summation der Einzeleffekte führen, wenn die Arzneien einen „gleichen Angriffspunkt" haben, während es zu einem weit über dem Additionsergebnis der Einzeleffekte liegenden Gesamteffekt kommt, wenn die einzelnen Glieder der Medikamentenmischung unter sich verschiedene pharmakologische Angriffspunkte haben [s. dagegen Berner und Woker[2]) u. a.]. Wir konnten bei kombinierter Aktion zweier Mittel auf Colpidien, unabhängig von der Identität oder Verschiedenheit der „Angriffspunkte" der Einzelkomponenten, im allgemeinen gleichartige Resultate erzielen, wobei der erzielte Gesamteffekt wesentlich von dem gegenseitigen Konzentrationsverhältnis der Agenzien abhängig war.

III.

Die ersten eingehenden Untersuchungen über die Beziehungen des Chinins zur Sauerstoffatmung sind durch Binz angestellt worden. Er konnte einwandfrei feststellen, daß bei septisch fiebernden Tieren der Sauerstoffverbrauch und die Kohlensäureproduktion erheblich (um etwa ein Drittel) reduziert werden, während bei gesunden Tieren und Menschen weit größere Chinindosen zur Erzielung eines ähnlichen Effektes notwendig sind. Die Herabsetzung der Oxydationen im Fieber durch Chinin konnte von einzelnen späteren Untersuchern bestätigt werden, bei Gesunden konnte jedoch eine Abnahme des Sauerstoffverbrauchs meist nicht festgestellt werden. Binz hatte auch nachgewiesen, daß das Chinin schon in sehr schwachen Konzentrationen (1 : 20000) die Guajacreaktion hemmt; nach Pflüger und Heubach[3]) wirkt das Alkaloid schon in sehr ver-

---

[1]) Bürgi, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 8.

[2]) Berner und Woker, Zeitschr. f. allg. Physiol. 13, 1912.

[3]) Pflüger und Heubach, zit. nach Binz.

dünnter Lösung (1 : 14 000) äußerst energisch auf die Lichtentwicklung der Leuchtbakterien.

An Einzelligen haben zuerst Giemsa und v. Prowazek[1]) festgestellt, daß unter dem Einfluß des Chinins der Sauerstoffverbrauch herabgesetzt wird; sie wiesen auch nach, daß die Chininwirkung bedeutend verstärkt wird, wenn die Colpidien unter Ausschluß des Luftsauerstoffs (Wasserstoffatmosphäre) der Wirkung des Alkaloids ausgesetzt werden.

Um den Einfluß des Chinins auf die Zelloxydationen zu beobachten, verwendeten wir zunächt die sog. „Oxydasereaktion", die bekanntlich auf einer oxydativen Indophenolblausynthese aus α-Naphthol und Dimethylparaphenylendiamin beruht. Sie wurde im Prinzip von Ehrlich[2]) schon im Jahre 1885 angegeben, in neuerer Zeit von anderen Autoren für mikrochemische Untersuchungen dienstbar gemacht. Bringt man bestimmte Gewebsschnitte in eine Mischung von α-Naphthol und Dimethylparaphenylendiamin (je 1°/₀ wässerig), so nehmen sie bald eine intensiv blaue Farbe an. Die mikroskopische Untersuchung läßt dann in den Zellen mehr oder weniger zahlreiche intensiv blau gefärbte Granula erkennen, die allgemein als der Sitz der Oxydationsfermente angesehen werden, als die Orte, wo der aufgenommene molekulare Sauerstoff aktiviert wird.

Bringt man nun Colpidien in das Diamingemisch, so nehmen dieselben bald eine intensive blaue Färbung an; das Mikroskop zeigt im Protoplasma diffus verstreut zahlreichste feinste blaugefärbte Granula, daneben aber auch größere, nur in ihrer Peripherie tingierte runde Gebilde. Läßt man auf Colpidien zunächst Chinin einwirken und stellt dann, nach einmaligem Waschen der Infusorien in Leitungswasser, die Reaktion an, so ist der Ausfall derselben je nach der verwendeten Konzentration und der Einwirkungsdauer des Chinins verschieden. Durch hohe Konzentrationen des letzteren (1 : 200) abgetötete Colpidien lassen meist die Indophenolblausynthese in ihrem Protoplasma völlig vermissen, mittlere Konzentrationen führen nur zu einer geringen Abnahme der Blaufärbung oder lassen gar keine Differenz gegenüber den Kontrollen erkennen. Bei Anwendung schwacher, die Infusorien nicht abtötender Chinin-

[1]) l. c.

[2]) Ehrlich, Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. 1885.

konzentrationen kann oft sogar eine intensivere Blaufärbung der Colpidien beobachtet werden als im Kontrollpräparat.

Die Beurteilung des Reaktionsausfalles ist nicht einfach, da auch andere Inhaltsgebilde des Protoplasmas, wohl infolge Aufnahme des diffundierten blauen Farbstoffes, eine blaue Tinktion annehmen können, Gebilde, die mit den Oxydationsprozessen in der Zelle sicherlich nichts zu tun haben. Das Indophenolblau ist ja bekanntlich auch ein guter Fettfarbstoff und demnach können in durch Chinin entmischten Colpidien die Lipoidtröpfchen blau gefärbt erscheinen. Die bloße makroskopische Betrachtung des Präparates kann deshalb leicht irreführen, und das Verhalten der feinsten, punktförmigen Granulationen muß für die Beurteilung des Reaktionsausfalles richtunggebend sein. Wichtig ist auch, stets nur frische Lösungen von α-Naphthol (heiß gelöst und nach dem Erkalten filtriert) und Dimethylparaphenylendiamin zu verwenden.

Einwandfreier gestalteten sich die Versuche an Pflanzenzellen. Bringt man Blätter von Elodea canadensis in das Diamingemisch, so nehmen sie bald eine tiefdunkle blaue Farbe an. Läßt man jedoch vorher Chinin (1 : 100) einwirken, so bleibt die Blaufärbung vollkommen aus.

Nach diesen Versuchen scheint der Endeffekt der Chinineinwirkung auf Colpidien und Pflanzenzellen in einer Erstickung durch Hemmung jener Reaktionen, die den aufgenommenen Sauerstoff aktivieren, zu beruhen.

Der nächste Schritt war nun, auch an hochorganisierten Tieren die Beeinflussung der Oxydationsprozesse durch Chinin mittels jener Reaktion zu studieren. Zunächst töteten wir Ratten durch hohe Dosen subcutan eingesprizten Chinins, fertigten uns von verschiedenen Organen (Gehirn, Leber) ohne jede Vorbehandlung Gefrierschnitte an und setzten sie der Wirkung des Diamingemisches aus. Die Resultate waren jedoch nicht eindeutig, in der Mehrzahl der Fälle war ein Unterschied in der Intensität der Blaufärbung gegenüber Organschnitten aus durch Entbluten oder Nackenschlag getöteten Tieren nicht wahrnehmbar.

Erfolgreicher schien uns der Versuch zu sein, die Beeinflussung der Indophenolblausynthese durch Chinin in vivo zu beobachten. Ehrlich hat bekanntlich im Jahre 1885 gezeigt, daß wenn man einem Kaninchen eine Lösung, die je $^1/_2$ $^0/_0$ Dimethylparaphenyldiamin und α-Naphthol enthält, intravenös bis zum Eintritt des Todes injiziert, bei der mit möglichster Beschleunigung vorgenommenen Sektion eine primäre Verbläuung

des Hirngraues, Herzens, der Nierenrinde, Submaxillaris und bestimmter Muskelgruppen zu konstatieren ist; die Lunge erscheint primär farblos, die Leber nur schwach blau gefärbt. Die Oxydation des Farbstoffes zu Blau erfolgt in den Organzellen selbst und bildet die Intensität der primären Blaufärbung unter bestimmten Einschränkungen einen Gradmesser der intravitalen Sauerstoffspannung, der Lebhaftigkeit der Oxydationsprozesse in den betreffenden Organzellen. Voraussetzung für die Erzielung eines einwandfreien Ergebnisses ist die Autopsie unmittelbar nach dem Tode oder noch besser während der Agone; denn sehr bald tritt die Reduktionsfähigkeit der Organe (besonders beim Gehirn) in Aktion, das Indophenolblau wird zu Indophenolweiß reduziert und damit das Sektionsbild wesentlich geändert.

Wir stellten unsere Versuche an Meerschweinchen an und injizierten zunächst einem Tiere von 250 g intravenös 4 ccm einer Lösung, die je $^1/_2$ $^0/_0$ α-Naphthol und Dimethylparaphenylendiamin enthielt. Das Tier war unmittelbar nach der Einspritzung stark beschädigt und starb nach 5 Minuten unter Krämpfen. Die sofortige Sektion ergab intensive primäre Blaufärbung der Hirnrinde, des Herzens, schwache Blaufärbung der Leber, Submaxillaris, des Nierenmarks, Zwerchfells und des Dünndarms, und eine farblose Lunge. Bald nach der Sektion war die Blaufärbung der Hirnrinde verschwunden, die Färbung der übrigen Organe nahm an der Luft noch zu, um dann auch innerhalb verschiedener Zeit ihren blauen Farbenton ganz zu verlieren.

Ein zweites Meerschweinchen von demselben Gewicht erhielt zunächst 1,5 ccm einer 1 $^0/_0$ igen Lösung von Chininum hydrochloricum (in physiolog. Kochsalzlösung) intravenös und nach 1 Minute 4 ccm des obigen Diamingemisches in die zweite Jugularis. Tod nach 4 Minuten. Die sofortige Sektion ergab die Hirnrinde absolut nicht gefärbt, auch an der Luft nicht nachbläuend, Herz, Zwerchfell und Dünndarm leicht blau tingiert, die übrigen Organe farblos. An der Luft nahmen alle Organe, mit Ausnahme des Gehirns, einen intensiv blauen Farbenton an, der, in seiner Intensität kaum abnehmend, durch mehrere Stunden bestehen blieb.

Ein drittes Meerschweinchen diente wieder als Kontrolle und erhielt das Diamingemisch allein, ohne Chinin, intravenös

injiziert. Es zeigte denselben typischen Organbefund wie das erste Tier.

Nach dieser Versuchsreihe konnten wir annehmen, daß Chinin, in entsprechend hoher Dosis intravenös injiziert, die Oxydationen, besonders im Bereich der Hirnrinde, hemmt. Den Einwand, daß das Diamingemisch infolge der durch das Chinin geänderten Resorptionsverhältnisse überhaupt nicht von den betreffenden Zellen aufgenommen worden sei, konnten wir dadurch widerlegen, daß wir Hirnstückchen nach vorherigem Kochen mit alkalischer Chromatlösung — wie Ehrlich angegeben — behandelten. Es trat sofort Blaufärbung der Hirnrinde auf als Beweis dafür, daß die beiden farbstoffbildenden Körper tatsächlich von den Organzellen aufgenommen, wegen Fehlens aktiven Sauerstoffes jedoch nicht oxydiert worden waren.

Ein zweiter Einwand, der gemacht werden könnte, ist, daß unter dem Einfluß des für das Zentralnervensystem toxischen Chinins der Sauerstoffverbrauch der grauen Substanz erhöht und dementsprechend ihr Reduktionsvermögen gesteigert werde. Unter dieser Voraussetzung wäre dasselbe Sektionsbild, also Farblosigkeit der Hirnrinde, resultiert.

Wird einem Meerschweinchen Methylenblau in $^1/_2{}^0/_0$ iger Lösung intravenös bis zum Eintritt des Todes injiziert, so erscheint das Gehirn bei der sofortigen Sektion nahezu farblos, während andere Organe mehr oder weniger intensiv blau gefärbt sein können. Der leicht reduzierbare Farbstoff wurde also in der Hirnrinde in das Leukoprodukt umgewandelt, ein Beweis dafür, daß auch diesem, am besten mit Sauerstoff versorgten Organ eine gewisse Reduktionsfähigkeit innewohnt. Wird jedoch einem zweiten Meerschweinchen zunächst 1,5 ccm Chinin (1 $^0/_0$) intravenös eingespritzt und nach 1 Minute dieselbe Methylenblaulösung wie oben injiziert, so erscheint das Gehirn nicht mehr farblos, sondern leicht blau gefärbt, als Beweis dafür, daß das Chinin die Reduktionsfähigkeit, den Sauerstoffverbrauch, nicht gesteigert hatte.

Wichtig für alle derartigen Versuche, besonders aber für die Beurteilung der Beeinflussung der intravitalen Indophenolblausynthese durch das Chinin, ist die Injektion optimaler Dosen des letzteren. Die eingespritzte Dosis muß nahe der letalen sein. Injiziert man geringere Mengen, die von dem Tiere an-

standslos ertragen werden, so wird das nachträglich zugeführte Diamingemisch — ganz wie bei dem Kontrolltier — im Hirn, Herzen usw. zu Indophenolblau oxydiert. Spritzt man jedoch größere Mengen Chinin ein, so erliegt das Tier zu rasch, als daß die Reaktion überhaupt zustande kommen könnte.

Um von dem Nachteil einer allzu akuten Chininwirkung frei zu sein, injizierten wir das Mittel einigemal in hohen Dosen intraperitoneal. Wir hofften, so ein längeres Intervall einer schweren Vergiftung des Tieres zu erzielen und so bequemer die Beeinflussung der Oxydationsprozesse im Gehirn nachweisen zu können. Werden einem Meerschweinchen von 240 g 7 ccm 1 % ige Chininlösung intraperitoneal injiziert, so bleibt es durch 4 bis 5 Minuten völlig munter. Dann treten plötzlich die ersten Vergiftungserscheinungen auf und schon nach ca. 4 weiteren Minuten geht das Tier ein. Wir injizierten nun 5 Tieren zunächst Chinin intraperitoneal und dann sofort nach dem Erscheinen der ersten Vergiftungssymptome 8 ccm des Diamingemisches intravenös. Nur 2 mal überlebten die Tiere ganz kurz diese Einspritzung, und ergab die Sektion eine Abnahme der Blaufärbung der Hirnrinde gegenüber den Kontrollen. In den 3 übrigen Versuchen waren die Meerschweinchen schon vor Beendigung der intravenösen Einspritzung tot.

Wir haben nun nach dem Vorgange Ehrlichs auch Versuche mit Alizarinblau S durchgeführt. Wird dieser Farbstoff in Wasser gebracht, so resultiert eine dunkelbraune kolloidale Lösung. Wird eine gesättigte Lösung des Alizarinblau S Meerschweinchen subcutan oder intravenös injiziert, so gehen die Tiere je nach der Injektionsart und der zugeführten Farbstoffmenge mehr oder weniger rasch unter Krämpfen ein. Die sofortige Sektion ergibt eine starke Blaufärbung der Hirnrinde, des Herzens, bestimmter Muskelgruppen, sehr intensive Blaufärbung der Submaxillaris, während die Leber und besonders die Lunge primär farblos erscheinen. Es zeigt sich also eine gute Übereinstimmung mit den Versuchen der intravitalen Indophenolblausynthese. Während aber die Blaufärbung der Organe nach der Injektion des Diamingemisches die lokale Oxydation der beiden farbstoffbildenden Körper anzeigt, ist die Blaufärbung nach Alizarinblau-S-Injektion ganz anders zu beurteilen. Ehrlich hat nachgewiesen, daß Alizarinblau S

schon im Blute zu dem blauen Farbstoff oxydiert wird und daß demnach die Intensität der Blaufärbung der Organe davon abhängig ist, wieviel blauer Farbstoff aufgenommen und in welchem Maße derselbe innerhalb der Organzellen wieder reduziert wird. Das Organ, das den Ort des stärksten Reduktionsvermögens darstellt, die Lunge, erscheint farblos, die Hirnrinde, das Herz und die Submaxillaris sind deshalb so intensiv blau tingiert, weil sie viel von dem blauen Farbstoff aufnehmen und weil ihr Reduktionsvermögen zu gering ist, um das schwer reduzierbare Alizarinblau in das Leukoprodukt überzuführen. Die übrigen Organe stehen bezüglich Farbstoffaufnahme und Reduktionskraft in der Mitte zwischen diesen Extremen.

Wir injizierten nun einem Meerschweinchen von 240 g 5 ccm einer gesättigten Alizarinblau-S-Lösung intravenös. Das Tier ging nach 1 Minute unter Krämpfen ein. Die sofortige Sektion ergab das oben skizzierte Bild in typischer Ausprägung.

Ein zweites Meerschweinchen erhielt zunächst 1,6 ccm Chinin (1 $^0/_0$) intravenös und 1 Minute darauf 5 ccm der Alizarinblau-S-Lösung in die zweite Jugularis. Tod nach 2 Minuten. Das Gehirn erschien farblos, ebenso die übrigen Organe mit Ausnahme von Herz und Submaxillaris, die eine ganz leichte blaue Tinktion zeigten.

Um zu eruieren, ob hier eine Hemmung der Blaubildung im Blute oder aber eine nachträgliche Reduktion des blauen Farbstoffes in den Organen mit im Spiele war, wurden einem 850 g schweren Kaninchen 9 ccm einer gesättigten Alizarinblaulösung subcutan injiziert. 5 Minuten darauf begann die Haut blau zu werden; nach 25 Minuten wurde das Schädeldach trepaniert und eine deutliche Blaufärbung der Hirnoberfläche konstatiert. In der 30. Minute erhielt das Tier 4 ccm einer 1 $^0/_0$igen Chininlösung intravenös und starb nach 3 Minuten, ohne daß die Blaufärbung des Gehirnes eine Abnahme, also eine Reduktion des Farbstoffes, als Ausdruck eines durch das Chinin gesteigerten Sauerstoffverbrauches hätte erkennen lassen (Sektion).

Wir müssen daher schließen, daß das Chinin die Oxydation des Alizarinblau S im Blute hemmt.

Derselbe Versuch wurde auch an Meerschweinchen mit demselben Resultat wiederholt.

Die oben angeführten Experimente mit küpenbildenden Farbstoffen sind nur ein Teil der großen Versuchsreihe an Meerschweinchen und Kaninchen, die wir zum Studium der Beeinflussung der Sauerstoffatmung durch das Chinin durchgeführt haben.

Fassen wir nun die Ergebnisse dieses Kapitels über Chinin und Sauerstoffatmung zusammen, so kommen wir zu dem Schlusse, daß das Alkaloid in entsprechender Konzentration die Sauerstoffatmung behindert resp. sistiert, während kleine Mengen die Oxydationen nicht beeinflussen oder sogar steigern können. An Colpidien und Pflanzenzellen war dieser Nachweis relativ einfach, am höher organisierten Tiere sind die Verhältnisse viel komplizierter. Immerhin sind wir besonders durch die Beobachtung am Gehirn, das bei seinem Lipoidreichtum und der hohen Bedeutung der Oxydationsprozesse für seine Funktion für die Schädigung durch das Chinin besonders disponiert erscheint, also ein sehr empfindliches Reagens für die Störung der Sauerstoffatmung abgibt, zu dem Schlusse gelangt, daß auch beim hochorganisierten Tiere der Endeffekt der Chininwirkung in einer Behinderung der intracellulären Oxydationsprozesse zu suchen ist.

Laqueur[1]) hat in einer Arbeit über die Wirkung des Chinins auf Fermente nachgewiesen, daß es in sehr verdünnten Lösungen (0,001 $^0/_0$) die Tätigkeit bestimmter Oxydationsfermente fördert, während höhere Konzentrationen ihre Funktion hemmen resp. sistieren. Derselbe Autor hat auch nachgewiesen, daß auch andere fermentative Prozesse durch das Chinin beeinflußt werden, jedoch nicht gleichartig, denn bei einzelnen konnte durch das Alkaloid nur eine Förderung, bei anderen nur eine Hemmung der Fermenttätigkeit konstatiert werden. Bei der hohen Aktivität des Chinins [Traube[2])] ist es demnach selbstverständlich, daß sich seine Wirkung im Tierkörper nicht einfach mit der Beeinflussung der Sauerstoffatmung erschöpft. Immerhin ist dieser Einfluß, mit Rücksicht auf die essentielle Bedeutung der

---

[1]) Laqueur, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 55, 1906.
[2]) Traube, Kolloidchem. Beihefte 1912.

Oxydationsprozesse gerade für die Funktion der lebenswichtigsten Organe, als der wichtigste Teil der Chininwirkung anzusehen.

Der feinere Mechanismus der Beeinflussung der Sauerstoffatmung durch das Chinin scheint nach unseren Experimenten nicht auf einer Behinderung der Sauerstoffaufnahme durch die Zellen zu beruhen. Es handelt sich demnach nicht um eine einfache Sperrung der Sauerstoffzufuhr. Dieser Prozeß, der der gewöhnlichen Erstickung der Zelle entsprechen würde, hätte ja zur Folge, daß die Tätigkeit der Oxydationsfermente unbeeinflußt bleiben und die Sauerstoffgier der Zelle, beurteilt nach ihrem Reduktionsvermögen, steigen würde. Besonders unsere Versuche mit Methylenblau und Alizarinblau S sprechen gegen diese Annahme. Wir müssen vielmehr eine direkte Beeinflussung der Oxydationsprozesse in der Zelle selbst annehmen, und zwar mit Rücksicht auf die Reversibilität der Chininwirkung bei nicht zu sehr fortgeschrittener Vergiftung (s. Colpidienversuche) und mit Rücksicht auf die anderen Versuchsergebnisse eine paralysierende (antikatalytische) Wirkung auf die Oxydationsreaktionen.

Wir haben wiederholt betont, daß bei unseren gesunden Versuchstieren nur hohe Chinindosen zu einer deutlichen Schädigung der Sauerstoffatmung geführt haben und ist ja eingangs erwähnt worden, daß andere Autoren durch Darreichung von Chinin bei gesunden Tieren und Menschen eine Alteration der Sauerstoffaufnahme und der Kohlensäureproduktion nicht nachweisen konnten. Im Fieber aber ist dieser Nachweis Binz deutlich gelungen. Im Fieber nun ist der Stoffwechsel der Zellen gesteigert, Sauerstoffaufnahme und Kohlensäureproduktion erhöht, und gerade diese Erhöhung des Zellstoffwechsels scheint die erhöhte Empfindlichkeit des Fiebernden gegenüber Chinin zu bedingen. In unseren Versuchen an Colpidien (II. Kapitel) haben wir ja nachweisen können, daß Zellen, deren Stoffwechsel durch kleinste Mengen eines Giftes gesteigert worden war, giftigen Chininlösungen gegenüber bedeutend empfindlicher waren als die normalen Kontrollzellen. Zur weiteren Stütze unserer Annahme, die übrigens schon von Binz vertreten wurde, wird es notwendig sein, auch an fiebernden Tieren das Verhalten der Sauerstoffatmung nach Chinindarreichung durch Injektion

küpenbildender Farbstoffe zu studieren. Wir hoffen, diese Versuche bald in Angriff nehmen zu können.

Die direkte Beobachtung an der Zelle lehrte uns, daß im Gefolge der Chininwirkung Entmischungsvorgänge im Zellprotoplasma auftreten, die besonders der Zustandsänderung der Zelllipoide ihre Entstehung verdanken. Der Zusammenhang der Lipoide mit den übrigen Plasmakolloiden wird gestört, sie nehmen Tropfenform an. Damit hört die innere Strukturspannung der Zelle auf, sie strebt der Kugelform zu (v. Prowazek). Es handelt sich hier um einen rein physikalischen Vorgang, wie er auch nach dem Eindringen anderer lipoidlöslicher Mittel in die Zelle zu beobachten ist. Dann konnten wir feststellen, daß das Chinin die Sauerstoffatmung der Zelle hemmt, eine Tatsache, die schon durch die Untersuchungen von Giemsa und v. Prowazek wahrscheinlich gemacht wurde. Es könnte nun, wie für die Wirkung indifferenter Narkotica, angenommen werden, daß jene Zustandsänderung der Lipoide den essentiellen Effekt des Chinins darstelle und daß die Hemmung der Oxydationen nur eine notwendige Folge dieser Zustandsänderung sei. Nun konnten wir aber beobachten, daß die beiden Prozesse einander gar nicht immer parallel gehen. Vollkommen entmischte Colpidien können noch lebhaft beweglich sein, und hohe Chininkonzentrationen töten die Zellen, bevor es noch zur Entmischung der Plasmakolloide gekommen ist. Auch ist durch v. Prowazek an Colpidien festgestellt worden, und wir konnten es an Pflanzenzellen bestätigen, daß die Giftwirkung des Chinins annähernd der van't Hoffschen Reaktionsgeschwindigkeit-Temperaturregel folgt. Endlich könnte unter der Voraussetzung der rein physikalischen Wirkung des Chinins auf die Plasmakolloide nicht verstanden werden, warum das Mittel in kleinsten Konzentrationen den Zellstoffwechsel, die Sauerstoffatmung erhöht, während höhere Dosen schädigend wirken. Die Annahme, daß das Alkaloid nach Art eines Paralysators direkt auf Oxydationsprozesse wirkt, umgeht diese Schwierigkeit.

Zusammenfassung.

Die vorliegende Arbeit enthält Untersuchungen über den Mechanismus der Chininwirkung, beobachtet an Colpidien, Trypanosomen, Pflanzenzellen, Meerschweinchen und Kaninchen

An Colpidien ließ sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Giemsa und v. Prowazek feststellen, daß es unter dem Einflusse des Chinins zu einer Zustandsänderung der Plasmakolloide, erkennbar an der tropfigen Entmischung des Protoplasmas und an der Störung der osmotischen Relation zu der Umgebung, kommt; dann wird der Kern und der Bewegungsapparat geschädigt und die Zelle stirbt ab. Die eigentliche Ursache des Zelltodes ist die Sistierung der Sauerstoffatmung durch das Chinin.

Die Trypanosomen ließen im Wesen dieselben Veränderungen erkennen, also Alteration des Protoplasmas, wobei die tropfige Entmischung wohl wegen des geringen Lipoidgehaltes dieser Zellen in den Hintergrund trat, dann Schädigung des Kernes und des lokomotorischen Apparates.

An Pflanzenzellen war auch eine deutliche Entmischung des Protoplasmas und Sistierung der Sauerstoffatmung durch das Chinin zu beobachten.

Die einzelnen Zellen einer Colpidien- oder Trypanosomensuspension zeigen große Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Chinin. Diese Unterschiede sind durch Differenzen in der Stoffwechselintensität der Einzelindividuen bedingt. Junge Zellen und solche, bei denen man durch Vorbehandlung mit Spuren eines Giftes den Stoffwechsel künstlich gesteigert hat, sind empfindlicher gegen höhere Konzentrationen des Alkaloids, sie sind jedoch resistenter gegen eben wirksame Grenzdosen des Mittels. Mit steigendem Alter der Zellen scheint — bis zu einer gewissen Grenze — die Resistenz zuzunehmen.

Bei kombinierter Wirkung zweier Gifte auf Colpidien ist der erzielte Gesamteffekt nicht bloß von der Natur, sondern auch von den gegenseitigen Konzentrationsverhältnissen der Agenzien abhängig. Man kann durch Variation der Konzentration des einen Giftes die Wirkung des zweiten beliebig verstärken, abschwächen oder auch unbeeinflußt lassen.

Bei Meerschweinchen und Kaninchen ließ sich durch Zufuhr entsprechender Dosen von Chinin eine deutliche Hemmung der Sauerstoffatmung besonders in der Hirnrinde nachweisen. Als Indicator diente das Verhalten küpenbildender Farbstoffe im Organismus.

Der Mechanismus der Oxydationshemmung in der Zelle

durch das Chinin besteht nicht in einer Behinderung der Sauerstoffaufnahme, sondern in einer direkten Beeinflussung der Oxydationsprozesse. Dabei scheint das Chinin nach Art eines Paralysators antikatalytisch zu wirken.

Demnach stellen die Zustandsänderung der Zellipoide und die Behinderung der Sauerstoffatmung die Hauptphasen der Chininwirkung dar. Dasselbe ist, wie bekannt, für die Wirkung indifferenter Narkotica ermittelt worden. Tatsächlich eignet sich das Chinin vorzüglich als lokales Anaestheticum (s. Morgenroth und Ginsberg). Zur Erzielung einer Allgemeinnarkose ist es ungeeignet, da es, wie aus unseren Tierexperimenten hervorgeht, erst in Dosen die Tätigkeit der Großhirnrinde beeinflußt, die nahe der letalen liegen.

Über die Umlagerung der Glucose bei alkalischer Reaktion, ein Beitrag zur Theorie der Katalyse.

Von

L. Michaelis und P. Rona.

(Aus dem biologischen Laboratorium des städtischen Krankenhauses am Urban.)

(Eingegangen am 18. November 1912.)

Mit 2 Figuren im Text.

1. Allgemeines über die Wirkungen der Alkalien auf Glucose.

Die erste Einwirkung von Alkalien auf eine frische Glucoselösung besteht in der schnellen Vernichtung der Birotation, ein Vorgang, der quantitativ von Osaka[1]) untersucht worden ist. Sehen wir von diesem schnell zu Ende gehenden Prozeß ab, so erfolgen die weiteren Veränderungen unter der Wirkung der Alkalien in zwei Stufen, zunächst die Umlagerung in andere Zuckerarten, die von Lobry de Bruyn[2]) untersucht worden ist, und dann die unter Bräunung einsetzende Zersetzung dieser Zucker. Die Umlagerung besteht darin, daß erstens aus der Glucose andere Aldosen werden, und daß zweitens auch Ketosen auftreten. Charakteristisch für diesen Prozeß ist, daß die polarimetrische Drehung der Lösung stark zurückgeht. Es ist zwar nicht gelungen, einen bestimmten Gleichgewichtszustand als Ende dieses Prozesses zu charakterisieren, aber offenbar nur aus dem Grunde, weil späterhin die zweite Art der Alkaliwirkung hinzutritt und die Erkennung der ersten Veränderung trübt. Es liegt daher die Vermutung nicht fern, daß

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. **35**, 661, 1900.

[2]) Recueil des trav. chim. des Pays-Bas **14**, 156 und 203; **16**, 262.

das eigentliche Ende dieser Wirkung gewissermaßen eine völlige Racemisierung wäre, in dem Sinne, daß verschiedene, entgegengesetzt drehende Aldosen und Ketosen mit der Gesamtdrehung 0 auftreten. Sicheres wissen wir darüber nicht, auch sind noch nicht alle Endprodukte dieses Prozesses bekannt. Nachgewiesen wurde von Lobry de Bruyn vor allem Glucose, Mannose, Fructose, und sicher scheint auch, daß das noch nicht alle Endprodukte sind.

Der zweite Prozeß, die Zerstörung, beginnt mit der bekannten Bräunung des Zuckers und verläuft zweifellos je nachdem Sauerstoff oder gar ein Oxydationsmittel wie H_2O_2 zugegen ist oder nicht, verschieden. In dieser Arbeit wollen wir hauptsächlich die Kinetik des ersten Prozesses, der Umlagerung, verfolgen und über den zweiten nur einige gerade für unseren Zweck notwendige Angaben machen.

Einen Anfang dazu macht schon unsere frühere Mitteilung über die Wirkung des Alkali auf Traubenzucker[1]). Wir wiesen darin nach, daß das Maßgebende nur die Hydroxylionenkonzentration ist, und daß z. B. die Hydroxylionenkonzentration des Blutes noch nicht ausreicht, um selbst in einigen Tagen schon den merklichen Beginn dieses Prozesses einzuleiten. Wir wiesen auch schon in Bestätigung der Angaben von Lobry de Bruyn darauf hin, daß selbst in Zuckerlösungen, die bei weit stärker alkalischer Reaktion schon weitgehend verändert waren und nur noch kaum ein Zehntel der ursprünglichen Drehung zeigten, die Menge der durch Reduktion bestimmten Zucker nicht verringert worden ist. Dies beginnt erst bei noch stärker alkalischer Reaktion. Hiermit haben wir ein Mittel, um den ersten Prozeß rein zu verfolgen, indem wir einfach Alkalitäten anwenden, die den durch Reduktion gemessenen Zuckergehalt noch nicht verändern, aber doch schon den polarimetrisch gemessenen Zuckergehalt herabsetzen.

In unserer früheren Mitteilung gaben wir Anhaltspunkte darüber, von welcher Hydroxylionenkonzentration an wir in meßbaren Zeiten den ersten Prozeß beginnen sehen. Jetzt soll zunächst gezeigt werden, bis zu welchen Hydroxylionenkonzentrationen wir gehen können, ohne das Verschwinden von

---

[1]) L. Michaelis und P. Rona, diese Zeitschr. 23, 364, 1910.

reduzierenden Zuckern mit merklicher Geschwindigkeit zu beobachten.

Wir benutzten hierzu folgende Versuche. Traubenzucker wurde mit einem Regulator versetzt, sofort polarimetrisch bestimmt und nach 24 Stunden polarimetrisch und durch Reduktion nach Bertrand bestimmt. Die Wasserstoffionenkonzentration wird in den Versuchen mit stärker alkalischer Reaktion sowohl bei Beginn wie am Schlusse des Versuchs elektrometrisch gemessen. Als Antisepticum wurde Toluol, in einigen Versuchen Thymol benutzt.

Phosphatgemische. 38°.
90 ccm Phosphatgemisch + 10 ccm Zuckerlösung.

[H˙] sofort	[H˙] nach 24 Std.	Phosphorsäuregehalt	Polarisation bei Beginn %	Reduktion bei Beginn %	Polarisation nach 24 Std. %	Reduktion nach 24 Std. %
$1{,}44 \cdot 10^{-8}$	—	m/3	1,03	—	1,08	1,12
$1{,}25 \cdot 10^{-8}$	—	m/7	1,08	—	1,03	1,06
$1{,}0 \cdot 10^{-8}$	—	m/70	1,10	—	1,06	—
$6{,}9 \cdot 10^{-12}$	—	m/3	1,05	—	0,08 (gelb)	0,96
$1{,}27 \cdot 10^{-11}$	—	m/7	1,05	—	0,11 (gelb)	0,98
$2{,}0 \cdot 10^{-11}$	$2{,}7 \cdot 10^{-11}$	m/3	1,06	—	0,39 (Stich gelb)	1,01

Glykokollmischungen.
90 ccm Glyk. + 10 ccm Zuckerlösung. Glykokoll überall n/10.

[H˙] sofort	[H˙] nach 24 Std.	Phosphorsäuregehalt	Polarisation bei Beginn %	Reduktion bei Beginn %	Polarisation nach 24 Std. %	Reduktion nach 24 Std. %
$1{,}95 \cdot 10^{-9}$	—	—	0,96	—	0,88	—
$7{,}6 \cdot 10^{-10}$	—	—	0,94	—	0,84	0,97
$3{,}4 \cdot 10^{-11}$	—	—	0,98	—	0,45	0,97
$6{,}8 \cdot 10^{-12}$	$1{,}9 \cdot 10^{-11}$	—	1,12	—	0,20	1,12

Boratmischungen (nach Sörensen).
90 ccm Borat + 10 ccm Zuckerlösung.

[H˙] sofort	[H˙] nach 24 Std.	Phosphorsäuregehalt	Polarisation bei Beginn %	Reduktion bei Beginn %	Polarisation nach 24 Std. %	Reduktion nach 24 Std. %
$2{,}6 \cdot 10^{-9}$	—	—	0,43!	0,98!	0,40!	0,98!
$2{,}2 \cdot 10^{-9}$	—	—	0,37!	—	0,36!	—
$1{,}4 \cdot 10^{-9}$	—	—	0,37!	0,98!	0,36!	0,97!

Bicarbonat (n/20).

[H˙] sofort	[H˙] nach 24 Std.	Phosphorsäuregehalt	Polarisation bei Beginn %	Reduktion bei Beginn %	Polarisation nach 24 Std. %	Reduktion nach 24 Std. %
$6{,}5 \cdot 10^{-9}$	$5{,}4 \cdot 10^{-9}$	—	1,13	—	1,15	1,10

Wir sehen hier, daß es Alkalitäten gibt, die die „Umlagerung“ mit sehr großer Geschwindigkeit bewirken, während in 24 Stunden eine „Zerstörung“ von reduzierenden Substanzen nicht bemerkt werden kann. Selbst bei $[H^{\cdot}] = 10^{-11}$ bis 10^{-12} bemerkt man erst Spuren einer Zuckerzerstörung.

Es konnte nun eingewendet werden, daß vielleicht auch schon bei niederer OH-Konzentration die Zerstörung von reduzierendem Zucker beginnt, wenn kräftig Sauerstoff eingeleitet wird. Hierüber geben folgende Versuche Auskunft.

Versuche mit ständiger Sauerstoffdurchleitung bei 37°. Die eingeklammerten Zahlen sind nur berechnet. Die Konstanz der gemessenen [H˙] während der Versuchsdauer wurde durch wiederholte Kontrollmessungen bestätigt.

Phosphatmischungen.

[H˙]	Phosphorsäuregehalt	Polarisation bei Beginn %	Reduktion bei Beginn %	Polarisation am Schluß %	Reduktion am Schluß %	Dauer des Versuchs
$(2{,}0 \cdot 10^{-6})$	m/15	1,12	—	1,13	—	6 Std.
$(2{,}0 \cdot 10^{-7})$	m/15	0,55	—	0,54	—	6 "
$(3{,}0 \cdot 10^{-8})$	m/18	1,13	—	1,14	—	6 "
$(2{,}0 \cdot 10^{-7})$	m/15	0,53	—	0,53	—	6 "
$(2{,}2 \cdot 10^{-8})$	m/15	0,42	—	0,40	—	
$(2{,}2 \cdot 10^{-8})$	m/15	0,75	—	0,76	—	
$(2{,}2 \cdot 10^{-8})$	m/15	0,19	—	0,19	—	
$(2{,}2 \cdot 10^{-8})$	m/15	0,83	—	0,83	—	
$(2{,}2 \cdot 10^{-8})$	m/15	0,89	—	0,89	—	
$3{,}5 \cdot 10^{-8}$	0,26 m	1,78	—	1,76	—	15 "
$3{,}1 \cdot 10^{-8}$	0,12	1,78	—	1,80	—	8 "
$3{,}4 \cdot 10^{-8}$	0,012	1,80	—	1,84	—	8 "
$1{,}3 \cdot 10^{-8}$	0,26	1,54	1,53	1,56	—	24 "
$1{,}2 \cdot 10^{-8}$	0,12	1,57	1,55	1,56	—	24 "
$1{,}7 \cdot 10^{-8}$	0,12	1,64	—	1,60	1,60	24 "
$4{,}9 \cdot 10^{-9}$	0,12	1,69	—	1,67	—	24 "

Versuche mit verdünnter Natronlauge gaben deshalb kein eindeutiges Resultat, weil ohne Regulator auch die allergeringste, analytisch kaum feststellbare Oxydation des Zuckers zu einer so erheblichen Zunahme der [H˙] nach 24 Stunden führte, daß an eine Konstanz der [H˙] gar nicht zu denken war.

So können wir zum mindesten sagen, daß selbst bei Alkalitäten bis zu fast 10^{-12} ohne Sauerstoffdurchleitung die Zerstörung innerhalb 24 Stunden noch gar nicht bemerkbar wird, und daß bei Sauerstoffdurchleitung, soweit es sicher kontrollierbar ist, bis zu etwa $5 \cdot 10^{-9}$, ein Unterschied gegen die O_2-freien Versuche nicht feststellbar ist. Bei stärker alkalischen Reaktionen können wir zuverlässige Angaben nicht machen, weil es nicht möglich war, bei O_2-Durchleitung die Reaktion genügend konstant zu erhalten. Das interessierte uns für die folgende Arbeit aber auch nicht, weil wir stets bei sorgfältigstem Ausschluß von O_2 arbeiteten.

Bei dieser Gelegenheit müssen wir zu den Arbeiten von W. Loeb[1]) Stellung nehmen, die in einem gewissen Gegensatz zu unseren Angaben stehen. Loeb hat im wesentlichen folgende Resultate:

[1]) W. Loeb, diese Zeitschr. 32, 43 und 52, 1911. — W. Loeb und S. Gutmann, diese Zeitschr. 46, 288, 1912.

1. **Bei Gegenwart von H_2O_2 wird die Zuckeroxydation bei alkalischer Reaktion durch die Anwesenheit von Phosphationen beschleunigt, und zwar um so mehr, je mehr Phosphationen zugegen sind.**

Hiergegen wenden wir ein: Bei der Oxydation des Zuckers durch H_2O_2 entstehen Säuren, die die Alkalität der Lösung vermindern. Und zwar wird die Abnahme der OH-Ionen um so bedeutender sein, je schwächer konzentriert das Phosphatgemisch ist, weil ein Phosphatgemisch um so stärker „reguliert", je stärker es ist. Durch die Abnahme der Alkalität wird die Oxydation des Zuckers gehemmt. Die Oxydation des Zuckers erzeugt gleichsam einen „negativen Autokatalysator", d. h. Säuren, die je nach der Konzentration der Phosphate von wechselnder Bedeutung sind.

Aus demselben Grunde ist auch die Wirkung eines Phosphat- und z. B. eines Glykokollgemisches von gleicher $H^{\cdot}$-Konzentration nicht miteinander vergleichbar, sobald, wie es hier der Fall ist, während des Prozesses eine Änderung der $H^{\cdot}$-Konzentration eintritt und man nicht weiß, in wieweit.

Man darf nicht etwa glauben, daß die Änderung der Alkalität so gering sei, daß man sie vernachlässigen dürfe. Loeb hat sich immer damit begnügt, die anfängliche $H^{\cdot}$-Konzentration zu berechnen. Dieses Verfahren können wir nicht als ausreichend erklären.

2. **Die begünstigende Wirkung der Phosphationen wird durch Glykokollgemische von gleicher $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration vermindert, nicht aber durch Boratgemische.**

Hiergegen können wir folgendes einwenden: Das Glykokoll wird bei alkalischer Lösung durch H_2O_2 oxydiert unter Säurebildung. Darum hemmt es die Oxydation des Zuckers, die von der Alkalität abhängig ist. Beim Boratgemisch fällt das fort.

Trotzdem wollen wir nicht in Abrede stellen, daß bei der Glucolyse durch Oxydationsmittel und wohl auch bei der fermentativen Glucolyse die Phosphationen eine besondere Rolle spielen. Wir haben diesen Gegenstand selbst auf andere Weise verfolgt und werden bei anderer Gelegenheit darüber berichten. Aber in den Loebschen Versuchen liegt kein Beweis für eine besondere Rolle der Phosphationen.

Was schließlich die Wahl der von Loeb zum Vergleich mit den Phosphaten gewählten Regulatoren betrifft, so konnten wir mit den Glykokollmischungen nicht erreichen, daß die $[H^{\cdot}]$ sich in 24 Stunden konstant hielt; es treten gewisse noch zu untersuchende chemische Änderungen ein, die mit Säuerung einhergehen. Und Boratgemische haben ihre großen Bedenken, weil Borsäure mit Kohlenhydraten komplexe Verbindungen gibt, die sich bei stärker alkalischen Boratgemischen schon darin äußern, daß die Drehung einer solchen Borat-Zuckerlösung sofort nach dem Vermischen eine ganz andere ist als dem Zuckergehalt entspricht (vgl. S. 449, Versuche „Boratmischungen", die mit ! bezeichneten Zahlen).

2. Der quantitative Einfluß der Hydroxylionen.

Um den Einfluß der Hydroxylionen auf die Umlagerung der Glucose zahlenmäßig auszudrücken, verwendeten wir folgende Methode. Versetzt man eine reine (nicht mehr birotierende) Glucoselösung mit Alkali, so ist die Drehungsabnahme in den ersten Stadien des Prozesses der Zeit proportional, d. h. die Geschwindigkeit des Prozesses ist für eine gewisse Strecke sehr angenähert eine gleichförmige. Wir benutzen als Maß für die Geschwindigkeit daher einfach die Drehungsabnahme pro Stunde und dürfen zur Berechnung derselben nur die ersten Stadien des Prozesses benutzen, so lange nämlich die Drehungsänderung als eine geradlinige Funktion der Zeit aufgefaßt werden darf. Der Versuch zeigt, daß man dies auf eine für die praktische Rechnung völlig ausreichende Strecke tun darf. Die Versuche wurden durch Mischen der wässerigen, normal rotierenden Glucoselösung mit geeigneten Alkalilösungen angestellt, sofort und in geeigneten Abständen Proben von 10 ccm entnommen, die durch Zusatz von 1 ccm Essigsäure zur Sistierung der Alkaliwirkung auf eine ungefähr neutrale oder leicht saure Reaktion gebracht und polarisiert wurden. Da wir nur die ersten Stadien des Prozesses für die Berechnung benutzen konnten, wo die Umsätze noch klein sind, so sind die relativen Beobachtungsfehler öfters merklich. Wir glichen sie nach Möglichkeit auf graphischem Wege aus, indem wir eine gerade Linie so zogen, daß alle beobachteten Punkte für dieselbe berücksichtigt wurden, und zwar die späteren bis zu einer Drehungsverminderung von 1° wegen ihrer geringeren relativen Fehler etwas mehr als die früheren.

Die Wasserstoffionenkonzentration wurde in den Flüssigkeiten zu Beginn und nochmals zum Schluß des Versuches elektrometrisch gemessen und nur diejenigen Versuche benutzt, in denen eine merkliche Veränderung der Alkalität nicht eingetreten war. Um dies zu erreichen, erwies sich als unbedingt erforderlich, die Versuchslösungen mit einer hohen Schicht von flüssigem Paraffin zu bedecken, um Aufnahme und Abgabe von Kohlensäure zu verhindern. Die Versuche ergaben folgendes:

Tabelle I.

Bei den Versuchen wurden gleiche Teile der Glucoselösung (zirka 10 %ig) mit den Flüssigkeiten von bestimmter alkalischer Reaktion (in den Tabellen mit Fl. bezeichnet) zusammengemischt. Vor der Vermischung wurden alle Flüssigkeiten auf 25° vorgewärmt. Während der ganzen Dauer des Versuches standen die Lösungen in einem Wasserbad von genau 25°. In gewissen Zeiträumen wurden Proben aus dem Zucker-Alkaligemisch entnommen und die Alkaliwirkung durch Zusatz von Essigsäure aufgehoben.

	Stunden	Drehung Grad		
1	0	4,65	→ $p_H = 11,03$	Fl.: 2 Teile $^{m}/_{3}$-sek. Phosphat. 1 Teil $^{n}/_{3}$-NaOH
	3	4,50		
	5	4,32		
	23,5	3,31		
	28	3,15		
	32	3,03		
2	0	4,57	→ $p_H = 11,00$	Fl.: 2 Teile $^{m}/_{3}$-sek. Phosphat. 1 Teil $^{n}/_{3}$-NaOH
	3,8	4,41		
	7,8	4,14		
	24	3,30	→ $p_H = 10,94$	
3	0	4,53	→ $p_H = 11,29$	Fl.: 1 Teil $^{m}/_{3}$-sek. Phosphat. 1 Teil $^{n}/_{3}$-NaOH
	1,7	4,35		
	3,5	4,17		
	7,5	3,80		
	24	2,48	→ $p_H = 11,02$	
4	0	4,53	→ $p_H = 11,30$	Fl.: 1 Teil $^{m}/_{3}$-sek. Phosphat. 1 Teil $^{n}/_{3}$-NaOH
	1,7	4,46		
	4,2	4,08		
	23,1	2,54	→ $p_H = 11,26$	
5	0	4,77	→ $p_H = 7,66$	Fl.: 1 Teil $^{m}/_{3}$-prim. Phosphat. 20 Teile $^{m}/_{3}$-sek. Phosphat
	22	4,69	→ $p_H = 7,62$	
	73	4,66		
	120	4,69	→ $p_H = 7,59$	
6	0	4,69	$p_H = 10,16$	Fl.: ca. $^{n}/_{100}$-NaOH
	1,3	4,67		
	23	4,39	$p_H = 10,23$	
	51	4,08		
	107	3,70	$p_H = 11,10$	
7	0	4,68	$p_H = 10,65$	F.: ca. $^{n}/_{100}$-NaOH (mit $^{n}/_{10}$-KCl)
	3,5	4,57		
	25	4,03		
8	0	4,64	$p_H = 10,65$	Fl.: $^{n}/_{1}$-Na_2CO_3
	4,2	4,47		
	25	3,77		
	74	2,63	$p_H = 10,58$	
9	0	4,67	$p_H = 10,83$	Fl.: ca. $^{n}/_{50}$-NaOH
	3	4,56		
	8,5	4,32		
	24	3,82	$p_H = 10,92$.	

	Stunden	Drehung Grad		
10	0	4,85	$p_H = 11,47$	Fl.: ca. $^n/_{20}$-NaOH
	1,7	4,58		
	3,5	4,37		
	8,1	3,94		
	9,5	3,59		
11	0	4,59	$p_H = 11,87$	Fl.: ca. $^n/_{10}$-NaOH
	1,5	4,31		
	3,5	3,82		
	7,5	3,11		
	9	2,70		
12	0	4,63	$p_H = 11,74$	Fl.: ca. 0,15 n-NaOH
	2	4,16		
	2,7	4,97		
	3,2	3,91		
	4	3,68		
	4,4	3,63		
13	0	4,65	$p_H = 11,48$	Fl.: ca. $^n/_{20}$-NaOH
	1,6	4,38		
	2,9	4,27		
	4	3,96		

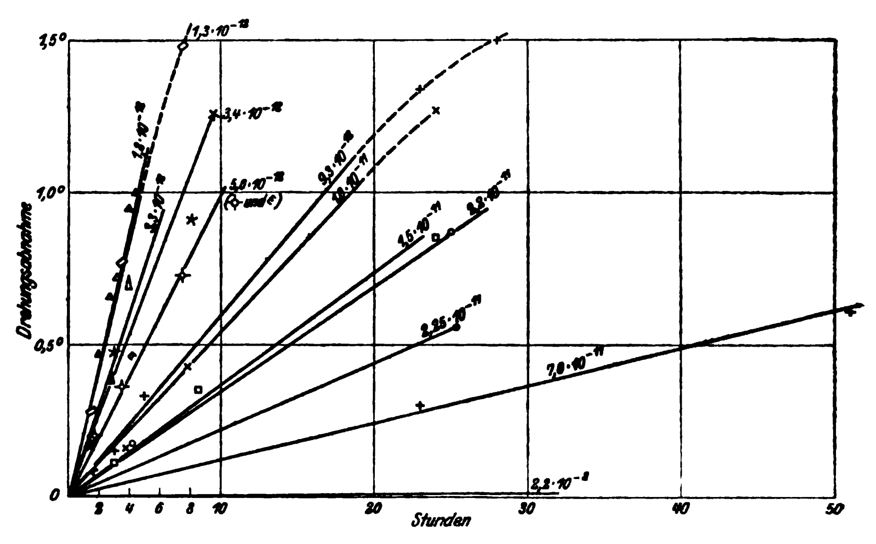


Fig. 1. Abszisse: Die Zeit in Stunden. Ordinate: Drehungsänderung. Die zu je einem zusammenhängenden Versuch gehörigen Punkte sind mit gleichen Zeichen markiert. Die punktierten Linien sind Gebiete, in denen der Verlauf nicht mehr geradlinig angenommen werden darf. Die zu jeder Versuchsreihe gehörige Wasserstoffionenkonzentration ist jeder Linie beigefügt.

Die Versuche sind in Figur 1 dargestellt. Berechnen wir nun für jede einzelne Wasserstoffionenkonzentration auf graphischem Wege die Umsatzgeschwindigkeit (sie ist gleich der Tangente des Neigungswinkels der Geraden) und stellen sie in Figur 2 als eine Funktion der Wasserstoffionenkonzen-

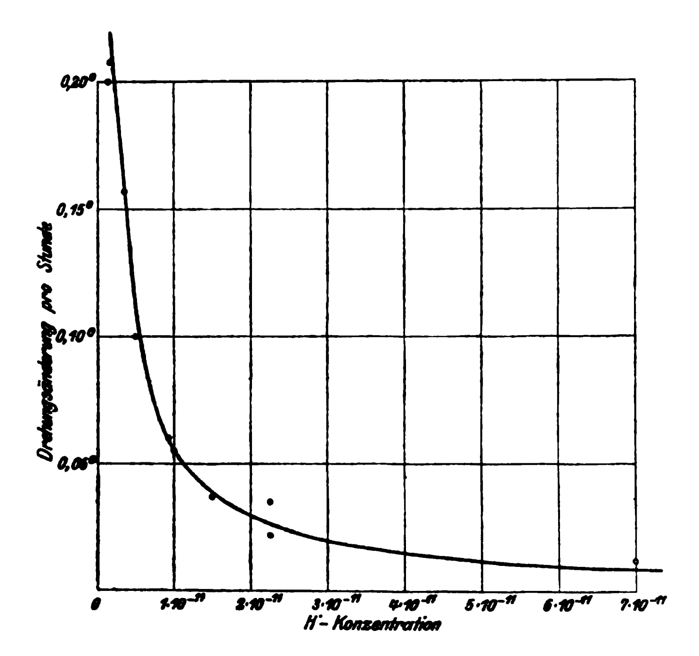


Fig. 2. **Abzisse:** Die Wasserstoffionenkonzentration. **Ordinate:** Die Drehungsänderung pro Stunde. Die ausgezogene Kurve ist eine gleichseitige Hyperbel von der Gleichung:

$$\text{Drehungsabnahme} \times \text{Wasserstoffionenkonzentration} = 5{,}5 \cdot 10^{-12}.$$

trationen dar, so erhalten wir mit guter Annäherung das Bild einer gleichseitigen Hyperbel. Das heißt also: Die Umsatzgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional der Wasserstoffionenkonzentration, oder was dasselbe ist, sie ist direkt proportional der Hydroxylionenkonzentration. Dementsprechend ist das Produkt aus der Wasserstoffionenkonzentration und der Umsatzgeschwindigkeit konstant. Die Konstanz des Produktes ist für die mittleren Werte gut, für die extremeren Werte nicht schlechter als es die Fehlergrenzen in diesem Bereich erlauben.

Tabelle II.

H-Ionenkonzentration [H˙]	Drehungsänderung pro Stunde, graphisch berechneter Mittelwert v	[H˙] × v
$1{,}8 \cdot 10^{-12}$	0,209	$0{,}38 \cdot 10^{-12}$
$1{,}3 \cdot 10^{-12}$	0,200	$0{,}26 \cdot 10^{-12}$
$3{,}3 \cdot 10^{-12}$	0,152	$0{,}50 \cdot 10^{-12}$
$3{,}4 \cdot 10^{-12}$	0,157	$0{,}53 \cdot 10^{-12}$
$5{,}0 \cdot 10^{-12}$	0,100	$0{,}50 \cdot 10^{-12}$
$9{,}3 \cdot 10^{-12}$	0,060	$0{,}55 \cdot 10^{-12}$
$1{,}0 \cdot 10^{-11}$	0,055	$0{,}55 \cdot 10^{-12}$
$1{,}5 \cdot 10^{-11}$	0,037	$0{,}55 \cdot 10^{-12}$
$2{,}2 \cdot 10^{-11}$	0,035	$0{,}77 \cdot 10^{-12}$
$2{,}25 \cdot 10^{-11}$	0,022	$0{,}49 \cdot 10^{-12}$
$7{,}0 \cdot 10^{-11}$	0,012	$0{,}84 \cdot 10^{-12}$
$2{,}2 \cdot 10^{-8}$	$< 0{,}0001$	—

Es handelt sich hier um eine katalytische Wirkung der Hydroxylionen, vergleichbar etwa der katalytischen Wirkung der OH-Ionen bei der Verseifung der Ester oder bei der Hydrolyse der Polysaccharide. Das Wesen dieser Katalyse ist uns bisher ganz unbekannt; in unserem Beispiel glauben wir aber einen Fall gefunden zu haben, wo wir das Wesen der Katalyse bis zu einem gewissen Grade aufklären können.

Es ist von jeher das Bestreben gewesen, die Katalyse in dem Sinne zu deuten, daß der Katalysator mit dem Substrat eine intermediäre Verbindung eingehe, an der sich die eigentliche chemische Umsetzung abspielt. Gerade aber bei der Katalyse durch H˙- und OH-Ionen versagt diese Erklärung, denn man könnte bis heute nicht angeben, welche intermediäre Bindung das H˙- oder das OH′-Ion mit dem Zucker eingehen könnte. Man war daher zu der vorläufigen Annahme gezwungen, daß diese Ionen ohne eine solche Bindung durch ihre bloße Anwesenheit wirken. Arrhenius[1]) ist bei dem Studium der Rohrzuckerhydrolyse durch Säure schon einmal auf diese Frage eingegangen und hat die Vermutung ausgesprochen, daß der Rohrzucker in zwei Formen existenzfähig sei, in der gewöhnlichen und in der sogenannten aktiven Form, welch letztere von labilem Charakter sei. Die Wirkung der H-Ionen beruhe nun darauf, daß sie die Menge der aktiven Moleküle vermehre. Welcher Art diese aktiven Moleküle seien, darüber hat er sich nicht geäußert.

[1]) Arrhenius, Zeitschr. f. physikal. Chem. 4, 226, 1889; 6, 10, 1889.

Unser Bestreben ging dahin, den H- oder OH-Ionen eine verständliche chemische Rolle zuzuerteilen und sie nicht gleichsam aus der Ferne wirken zu lassen. Wenn man nun überlegt, welche Beziehung das H-Ion wohl zum Zucker haben könnte, so kann man auf den Gedanken kommen, den Zucker als eine Säure aufzufassen, die imstande ist, ein H-Ion abzudissoziieren. Dann wäre das Anion des Zuckers jene aktive Modifikation, die der spontanen Zersetzung anheimfiele. Hierbei sind noch zwei Dinge aufzuklären: 1. wie stimmt die Annahme der Säurenatur des Zuckers qualitativ und quantitativ mit den Tatsachen überein, und 2. welches ist die Ursache für die Labilität des Zuckerions?

3. Die Säurenatur der Glucose.

Daß die Glucose eine schwache Säure sei, wird von vornherein nicht als unwahrscheinlich angesehen werden. Daß eine reine Glucoselösung nicht sauer reagiert, ist kein Widerspruch damit, denn nur solche Säuren können eine saure Reaktion erzeugen, deren Dissoziationskonstante wesentlich größer als die des Wassers ist. Die saure Natur solcher ganz schwachen Säuren äußert sich nur darin, daß sie „Natronlauge binden", d. h. daß sie die Hydroxylionenkonzentration der Lauge herabsetzen. In Übereinstimmung mit dieser Annahme fand C. Kullgren (im Laboratorium von Arrhenius), daß die Verseifung von Äthylacetat durch NaOH durch Zusatz von Rohrzucker herabgedrückt wird, was E. Cohen[1]) für mehrere Zuckerarten bestätigte. Die Säurenatur der Glucose wird durch eine zahlenmäßige Bestimmung ihrer Dissociationskonstanten erwiesen. Diese ist nun früher schon von Osaka[2]) nach Untersuchungen von Cohen berechnet und $= 5{,}9 \cdot 10^{-13}$ (bei 25°) gefunden worden. Wir verwendeten eine andere Methode, indem wir direkt die $H^{\cdot}$- bzw. OH'-Konzentration einer mit Zucker versetzten Lauge elektrometrisch bestimmten und sie mit der zuckerfreien Laugenlösung verglichen. Es wurde dazu CO_2-freie Lauge, nach der Methode von Sörensen[3]) hergestellt, benutzt. Die Differenz der OH'-Konzentration läßt sich

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. **5**, 8, 1890.

[2]) Zeitschr. f. physikal. Chem. **35**, 661, 1900.

[3]) S. P. L. Sörensen, diese Zeitschr. **21**, 168, Fußnote, 1909.

folgendermaßen zu einer Berechnung der Dissoziationskonstante verwerten.

Bezeichnen wir mit [G] die Gesamtkonzentration an Glucose, mit [G'] die Konzentration der Glucoseionen, so ist nach dem Massenwirkungsgesetz

$$k = \frac{[G'].[H^{\cdot}]}{[G] - [G']}.$$

Die Konzentration der Zuckerionen erfahren wir auf folgende Weise. Vergleichen wir die OH'-Konzentration der reinen Lauge mit der der Zuckerlauge, so enthält die letztere um ebensoviel weniger OH'-Ionen, als sie Zuckerionen enthält. [G'] ist daher gleich der Differenz der OH'-Ionen in der reinen Lauge und in der Zuckerlauge.

Die Versuche ergaben nun folgendes Resultat:

Alle Lösungen enthalten außer den in der Tabelle angegebenen Stoffen noch 0,1 n-KCl, um für die spätere elektrometrische Messung das Diffusionspotential gegen gesättigte KCl-Lösung zu vernichten.

	n-Gehalt der Lösung an		Temperatur	p_H gemessen
	NaOH	Glucose	°	
a)	0,01	0	19	11,90
	0,01	0,2	19	10,73
b)	0,02	0	19	12,32
	0,02	0,2	19	11,13
c)	0,01	0	19	11,99
	0,01	0,2	19	10,85
d)	0,02	0	19	12,28
	0,02	0,2	19	11,28
e)	0,03	0	16,5	12,63
	0,03	0,2	16,5	11,44

Aus diesen Daten berechnet sich die Dissoziationskonstante des Zuckers a) $5{,}3 \cdot 10^{-13}$, b) $5{,}5 \cdot 10^{-13}$, c) $4{,}8 \cdot 10^{-13}$, d) $3{,}8 \cdot 10^{-13}$, e) $6{,}7 \cdot 10^{-13}$, im Mittel $5{,}2 \cdot 10^{-13}$ in ganz guter Übereinstimmung mit dem Wert von Cohen ($5{,}9 \cdot 10^{-13}$ für 25°). Vorläufig mag diese Bestimmung genügen. Sie gibt jedenfalls die Größenordnung richtig wieder. Für ganz genaue Bestimmungen sind noch besondere Kautelen erforderlich, über die wir bei anderer

Gelegenheit berichten werden. Wir erwähnen noch vorläufig, daß wir die Säuredissoziationskonstante der Mannose, Galaktose und Saccharose von gleicher Größenordnung, die der Lävulose aber etwas größer fanden.

Wenn wir nun annehmen, daß die sich umwandelnde Molekülart nur das Zuckerion ist, und da die Umwandlung dieser Molekülart natürlich eine unimolekulare Reaktion ist, so müßte die jeweilige Umwandlungsgeschwindigkeit bei gegebener Temperatur von der Konzentration der Zuckerionen abhängen und dieser proportional sein. Da aber bei gegebener Zuckermenge die Menge der Zuckerionen der Wasserstoffionenkonzentration umgekehrt proportional ist, so muß auch die Umwandlungsgeschwindigkeit des Zuckers der Wasserstoffionenkonzentration umgekehrt proportional sein. Das aber ist es gerade, was wir soeben experimentell erwiesen haben. Die quantitativen Verhältnisse bestätigen also unsere Annahme, daß die Ionen des Zuckers einer spontanen Umwandlung unterliegen und daß die Wirkung der alkalischen Reaktion einfach darauf beruht, daß sie nach dem Massenwirkungsgesetz einen bestimmten Teil des Zuckers in Ionen umwandelt.

Wir haben hier nur ein Paradigma, auf welche Weise die „katalytische Wirkung" der Hydroxyl- oder Wasserstoffionen zustande kommt, und wir zweifeln nicht, daß es sich in manchen analogen Fällen ganz ebenso verhalten wird.

4. Die Ursache für die Labilität des Zuckerions.

Mit dieser Aufklärung ist aber vorläufig das Rätsel nur verschoben. Ist auch die Rolle der Hydroxylionen jetzt klar, so ist jetzt noch zu erörtern, worauf die Labilität des Zuckerions beruht. Wir können hier nur Vermutungen äußern, glauben aber doch, daß vielseitige Erfahrungen aus dem Gebiete der Chemie diese Vermutungen über das Niveau einer bloßen Spekulation erheben.

Vergegenwärtigen wir uns den Gleichgewichtszustand, welcher zwischen dem Zucker, dem Zuckerion und dem Wasserstoffion herrscht, so ist dieses Gleichgewicht wie jedes chemische Gleichgewicht ein dynamisches. In jedem Augenblick entstehen aus Zucker Zuckerionen und H-Ionen, und genau ebensoviel Zuckerionen und H-Ionen vereinigen sich wieder zu Zucker.

Betrachten wir den Kreislauf eines einzelnen Zuckermoleküls, so ist dieser folgender:

Zucker ⟶ Zuckerion + $H^{\cdot}$ ⟶ Zucker ⟶ usw. Es findet also abwechselnd in dem Zuckermolekül eine Substitution eines H-Atoms durch ein negatives Elektron und eine Resubstitution des letzteren durch ein H-Atom statt. Nun lehrt die Erfahrung, daß bei solchen Resubstitutionen das H-Atom häufig an eine andere Stelle des Moleküls eintritt, als die es verlassen hatte. Diese Tatsache ist vor allem von Emil Fischer[1]) an organischen Körpern mit asymmetrischen Atomkomplexen in Form der sogenannten Waldenschen Umkehrung sehr genau untersucht worden. Die Ursache dieser Umlagerung ist im vorliegenden Falle vielleicht keine genaue Analogie zu einer Waldenschen Umkehrung, sondern beruht vielleicht darauf, daß das Ion des Zuckers eine Enolkonstitution hat, von der Wohl und Neuberg[2]) gezeigt haben, daß sie für Glucose, Mannose und Fructose identisch sein muß, so daß aus dem Glucose-Ion, wenn es wieder zu undissoziiertem Zucker wird, ebensogut Glucose, wie Mannose, wie Fructose werden kann. Diese Autoren haben auch schon die Lobry de Bruynsche Umlagerung gerade durch die Annahme einer für die drei Zucker identischen Enolform erklärt. Wir erweitern diese Erklärung nur, indem wir zeigen, daß die Menge des als Enol bzw. als Ion vorhandenen Zuckers von der Wasserstoffionenkonzentration abhängen muß. Daß das Ion eines organischen Körpers eine andere Konstitution hat als der indissoziierte Körper, ist ja auch im Gebiete der Farbstoffchemie eine bekannte Erscheinung; so hat z. B. das undissoziierte Phenolphthalein immer nur lactoide, das Phenolphthalein-Ion immer nur chinoide Konstitution.

So halten wir es auch für wahrscheinlich, daß bei dem Kreislauf des Zuckers nicht immer wieder Glucose zurückgebildet wird, sondern daß das Wasserstoffatom auch an anderen Stellen des Zuckermoleküls wieder eintritt, als die es verlassen hatte. So werden einerseits optische Isomere, andererseits Ketosen gebildet, und das Gleichgewicht wird derart liegen,

---

[1]) Emil Fischer, Liebigs Ann. 381, 123, 1911.

[2]) A. Wohl und C. Neuberg, Chem. Ber. 33, 3095, 1900.

wie es der chemischen Wahrscheinlichkeit über das Nebeneinanderbestehen dieser verschiedenen Stoffe entspricht.

Zusammenfassung.

Es wird gefunden, daß die Geschwindigkeit der Umwandlung der Glucose durch Alkali der Hydroxylionenkonzentration proportional oder der Wasserstoffionenkonzentration umgekehrt proportional ist. Ferner wird die Säurenatur der Glucose erwiesen und ihre Dissoziationskonstante $= 5 \cdot 10^{-13}$ gefunden. Daraus wird die Hypothese abgeleitet, daß die „katalytische" Wirkung der OH'-Konzentration darauf beruht, daß sie die Konzentration der Zuckerionen nach dem Massenwirkungsgesetz erhöht und diese Zuckerionen spontan sich umlagern.

Diese spontane Umlagerung der Zuckerionen wird darauf zurückgeführt, daß bei dem auch im Gleichgewicht stets vor sich gehenden Kreislauf zwischen Zucker und Zuckerion Umlagerungsprozesse eintreten.

Über den Abbau einiger Polypeptide durch Bakterien.

II. Mitteilung[1]).

Untersuchungen mit nicht verflüssigenden Bakterien.

Von

Takaoki Sasaki.

(Aus dem Laboratorium des Kyoundo-Hospitals zu Tokio.)

(Eingegangen am 17. November 1912.)

Beim Studium der Literatur über proteolytische Bakterienenzyme tritt uns stets der Mangel eines festen Systems störend entgegen; denn die Angaben der Forschungsergebnisse gehen so weit auseinander, daß es fast unmöglich scheint, eine klare Übersicht zu gewinnen. Diese Verwicklung kann man wohl auf die Verschiedenheit sowohl der Forschungsmethodik als auch der Untersuchungsmaterialien zurückführen.

Die Erforschung der Bakterienenzyme gestaltet sich aus zwei Gründen kompliziert: einerseits sind die Bakterienenzyme selbst nicht einheitlich, andererseits sind die zu verwendenden Eiweißkörper recht kompliziert gebaute Stoffe. Die Aufgabe, überhaupt Enzyme rein darzustellen, ist leider noch nicht von Erfolg gekrönt worden. Dies zu erreichen hat man heutzutage noch wenig Aussicht, speziell was die Bakterienenzyme anbetrifft. Dagegen ist es dank den Arbeiten E. Fischers und seiner Mitarbeiter gelungen, anstatt der Eiweißkörper chemisch genau definierbare Polypeptide in die Hand zu bekommen. Infolgedessen hat die Kenntnis der Verdauungsenzyme durch die Arbeiten E. Abderhaldens und seiner Mitarbeiter beträchtliche Fortschritte gemacht. Es ist nun sehr wünschenswert, bei Versuchen mit Bakterienenzymen auch die Polypeptide zu verwenden, um wenigstens einen ganz klaren Faktor

---

[1]) T. Sasaki, I. Mitteilung. Diese Zeitschr. 41, 174, 1912.

in das Experiment einzuführen. Um sich also Fischers bekannten Vergleiches zu bedienen, könnte man den Ausdruck gebrauchen, zu einem bekannten Schlüssel sei ein entsprechendes Schloß zu suchen. Bekanntlich greifen die Enzyme der nicht verflüssigenden Bakterien nach Fermi[1]) andere genuine Eiweißkörper nicht an. Durch die Eijkmannsche[2]) Untersuchung stellte sich auch ausnahmslos heraus, daß das Vermögen, Milchagar aufzuhellen, und die Eigenschaft, Gelatine zu verflüssigen, miteinander Hand in Hand gehen. Hier ist also eine verflüssigende Bakterienprotease, die ausführlich von Fermi untersucht wurde, wahrscheinlich nicht im Spiele, und dies noch besonders in dem Falle, wo man künstliche Polypeptide gebraucht; denn diese Protease hat nur eine lösende Wirkung auf eigentliche Eiweißkörper, ist also eher dem Pepsin als dem Trypsin in bezug auf die Wirkungsweise ähnlich. Aus dem Grunde habe ich in meiner ersten Mitteilung mit Bact. coli commune Untersuchungen mit Glycyl-l-tyrosin und Glycylglycin angestellt, wobei ich Tyrosin in den Glycyl-l-tyrosinversuchen, Glykokoll als β-Naphthalinsulfoverbindung sowohl in den Glycyl-l-tyrosin- als auch Glycylglycinversuchen isolieren konnte. So ist klar nachgewiesen, daß es sich hier um einen erepsinartigen Spaltungsprozeß handelt. Allerdings hat schon Pfaundler[3]) die Analogie zwischen Colienzym und Erepsin hervorgehoben. Auch wurde von Vines[4]) behauptet, daß überhaupt den Mikroorganismen Fermente eigen sind, die bloß imstande sind, Albumosen, Peptone und von den eigentlichen Eiweißkörpern lediglich Casein zu spalten, wie es das Erepsin der Darmschleimhaut tut. Heute steht uns ein vorzügliches Mittel zur Charakterisierung der Fermente von Erepsinnatur[5]) zur Verfügung; denn Pepsin vermag kein künstliches Polypeptid, Trypsin native Eiweißkörper und Glycyl-l-tyrosin usw., aber nicht Glycylglycin, dagegen Erepsin beide genannten Polypeptide zu spalten, während es native Eiweißkörper anzugreifen

[1]) Cl. Fermi, Centralbl. f. Bakt. 7, 469, 1890; Arch. f. Hygiene 10, 1890.

[2]) C. Eijkmann, Centralbl. f. Bakt. 29, 841, 1901.

[3]) M. Pfaundler, Centralbl. f. Bakt. Orig.-Bd. 31, 113, 1902.

[4]) Zit. von Kruses Allgem. Mikrobiologie S. 493.

[5]) Vgl. Abderhaldens Lehrbuch d. physiol. Chem., 2. Aufl. 1909, S. 266.

außerstande ist. Es liegt daher der Gedanke nahe, daß auch anderen nicht verflüssigenden Bakterienenzymen Erepsinnatur zukommt. Ich habe deshalb versucht, das Verhalten anderer pathogener, nicht verflüssigender Bakterien Glycyl-l-tyrosin und Glycylglycin gegenüber zu untersuchen. Bei allen Versuchen gelang es mir, den hydrolytischen Abbau beider Dipeptide zu konstatieren. Zuerst habe ich mit lebenden Bakterien gearbeitet. Die Auskrystallisation des Tyrosins tritt frühestens nach 5 Tagen in Erscheinung. Dieser hydrolytische Abbau zeigte also wenigstens bei den untersuchten Bakterien unter der angestellten Versuchsanordnung einen Erepsincharakter.

Es ist sehr wünschenswert, auch mit Kulturfiltraten zu arbeiten. Vorläufig habe ich allerdings auf diesem Wege noch kein befriedigendes Resultat erzielt. Ich habe auch mit einem am energischsten Glycyl-l-tyrosin abbauenden verflüssigenden Vibrio eine ganze Reihe Proben angestellt, jeden zweiten Tag einzelne Proben durch Chamberlandfilter abfiltriert und in jedem Filtrate unter Toluolüberschichtung bei 37° Glycyl-l-tyrosin aufgelöst, was ich dann im Brutschrank stehen ließ. Bis zur 7. Probe verfuhr ich so, konnte jedoch nirgends Ausscheidung von Tyrosinkrystallen beobachten, jedoch Tyrosinasewirkung. Diesbezügliche weitere Untersuchungen und Experimente mit abgetöteten Bakterien sind in unserem Laboratorium im Gang.

Es müssen noch weiterhin mit verschiedenen Polypeptiden Untersuchungen angestellt werden. Abderhalden und Pringsheim[1]) haben folgende Beobachtungen gemacht: Sie ließen unter Verwendung der optischen Methode Preßsäfte einiger Schimmelpilze auf verschiedene Polypeptide einwirken, wobei sie verschiedene Resultate erzielten; Preßsaft aus Allescheria Gayonii spaltet nicht Glycyl-l-tyrosin, derselbe aus Mucor mucedo nicht l-Leucyl-d-leucin. Abderhalden und seine Mitarbeiter[2]) Teruuchi, Hunter, Lussana usw. haben auch das Verhalten verschiedener Organpreßsäfte gegen Polypeptide studiert. Merkwürdigerweise spaltete der Preßsaft der Kalbshirnsubstanz nicht das Glycyl-l-tyrosin. Es ist also nicht ausgeschlossen, daß auch von den Bakterienproteasen verschiedene Arten existieren, indem sie sich gegen verschiedene Polypeptide ungleich verhalten.

---

[1]) E. Abderhalden und H. Pringsheim, Zeitschr. f. physiol. Chem. 59, 249, 1909.

[2]) Die Literatur ist zusammengestellt in Oppenheimers „Die Fermente“, Spez. Teil, S. 172, 1909.

Experimenteller Teil.

I. Untersuchungen mit Typhusbacillen.

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Zu 25 ccm Fränkelscher Nährlösung ohne Asparagin, anstatt der Natronlauge mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht, in einem Erlenmeyerschen Kolben mit einem Wattepfropf versehen, setzten wir 1,0 g Glycyl-l-tyrosin ($C_{11}H_{14}N_2O_4 . H_2O$), das aus Chloracetyl-l-tyrosin[1]) nach der modifizierten Methode von E. Abderhalden und B. Oppler[2]) dargestellt wurde.

Das Gemisch sterilisierten wir in üblicher Weise im Kochschen Dampftopf, wobei Glycyl-l-tyrosin zunächst in Lösung ging. Nach dem Erkalten haben wir die Mischung mit zwei 24 Stunden alten Agarstrichkulturen von Typhusbacillen, die wir direkt aus den Faeces von Typhuskranken isoliert und auf Grund biologischer Eigenschaften und mittels Serumreaktion ganz sicher identifiziert hatten, in einigen Kubikzentimetern steriler physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, beschickt und dann im Brutschrank bei 37° stehen gelassen. Nach 9 Tagen begann die Auskrystallisation einer weißen Masse. Nachdem wir nach 4 Wochen eine Öse voll davon auf mehrere Agarplatten geimpft hatten, um die Reinheit der Bakterien zu konstatieren, haben wir die ganze Masse im Dampftopf sterilisiert und bis zum nächsten Tage im Eisschrank stehen gelassen. Die auskrystallisierte Masse wurde dann abfiltriert und mit kaltem Wasser sorgfältig gewaschen, abgepreßt und in einem Vakuumexsiccator über konz. Schwefelsäure getrocknet; sie wog 0,47 g. Die aus siedendem Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkrystallisierten typischen Tyrosinkrystalle (0,2 g) schmolzen bei ca. 292° (unkorr.).

Mit Typhusbacillen eines anderen Stammes wurde noch ein zweiter Versuch angestellt und in ganz derselben Weise verfahren: Erhalten wurde Tyrosin roh 0,35 g, nach Umkrystallisation 0,14 g, F. ca. 292° (unkorr.).

Zur Analyse wurden die beiden gereinigten Massen vereinigt, die ohne Zusatz von Tierkohle aus siedendem Wasser umkrystallisiert und bei 100° getrocknet waren. F. 298° (unkorr.)[3]).

Subst. 0,2110: CO_2 0,4588 H_2O 0,1156
" 0,0330: $^n/_{10}$-NH_3 3,9 ccm

$C_9H_{11}O_3N$ Ber.: C 59,64, H 6,12, N 7,74.
Gef.: C 59,30, H 6,13, N 7,66.

---

[1]) E. Fischer, Untersuchungen über Aminosäure usw., S. 344 bis 347.

[2]) E. Abderhalden und B. Oppler, Zeitschr. f. physiol. Chem. **53**, 296.

[3]) Für die Charakterisierung von Tyrosin ist der Schmelzpunkt wenig geeignet, denn die Angaben darüber in der Literatur sind ziemlich different. Wir haben auch selbst die Erfahrung gemacht, daß das Tyrosin aus Glycyl-l-tyrosin durch den bakteriellen Abbau trotz ausgezeichneter Übereinstimmung der Analysenzahl und sonstiger Eigenschaften einen differenten Schmelzpunkt zeigen kann.

Das mit Tierkohle geklärte Filtrat vom ersten Versuch haben wir abgedampft. Aus dem abgedampften Rückstande Glykokoll als Esterchlorhydrat zu isolieren gelang uns nicht. Aus dem Filtrate vom zweiten Versuch, das ebenfalls mit Tierkohle geklärt wurde, Glykokoll als β-Naphthalinverbindung abzutrennen, schlug ebenfalls fehl. Denn wir haben nach Behandlung des Filtrates mit β-Naphthalinsulfochlorid wie üblich einen harzartigen Niederschlag bekommen, aus dem wir ein reines β-Naphthalinsulfoglycin zu isolieren nicht imstande waren.

2. Glycylglycinversuch.

1,0 g Glycylglycin wurde in 25 ccm Fränkelscher Lösung ohne Asparagin, die mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht war, aufgelöst, dann wurden ganz wie beim Glycyl-l-tyrosinversuch zwei 24 Stunden alte Agarstrichkulturen von Typhusbacillen zugefügt. Nachdem wir die bakteriologische Reinheit nach 4 Wochen langem Stehenlassen im Brutschrank konstatiert hatten, haben wir die stark getrübte Flüssigkeit zuerst einfach abfiltriert. Das noch trübe Filtrat wurde nach der Neutralisation mit einigen Tropfen verdünnter Essigsäure unter Zusatz von Tierkohle auf dem Wasserbade erhitzt, sodann das nunmehr klare Filtrat auf dem Wasserbade ganz abgedampft und in ca. 15 ccm Wasser aufgelöst, wieder abfiltriert und endlich mit 6,0 g β-Naphthalinsulfochlorid in üblicher Weise behandelt. Die zuerst auskrystallisierte, mit kaltem Wasser sorgfältig chlorfrei gewaschene und über konzentrierte Schwefelsäure getrocknete Masse wog 2,45 g (entsprechend 0,69 g Glykokoll. Die Substanz war schon fast rein, sinterte bei ca. 149°, schmolz bei 152° (unkorr.). Nach einmaliger Umkrystallisation (Ausbeute 1,95 g) aus heißem Wasser schmolz sie bei 156° (unkorr.). Bei der Mischprobe erwies sie sich als identisch mit dem aus Glykokoll „Kahlbaum" dargestellten β-Naphthalinsulfoglycin.

Zur Analyse wurde sie im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,20609: CO_2 0,4100 H_2O 0,0802
" 0,2097: $^n/_{10}$-NH_3 8,0 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: C 54,34, H 4,15, N 5,28.
Gef.: C 54,28, H 4,36, N 5,35.

II. Untersuchungen mit Paratyphus A-Bacillen[1]).

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Ganz wie Typhusbacillenversuch behandelt. Beginn der Auskrystallisation der Tyrosinkrystalle nach 5 Tagen.

---

[1]) Die Bakterien von Paratyphus A und B, Dysenterie Shiga-Kruse, Dysenterie Flexner, Hühnercholera haben wir vom hygienischen Institut der Universität und vom Institut für Infektionskrankheiten zu Tokio bekommen. Mit den Bakterien aus dem ersteren haben wir Vorversuche und mit den aus dem letzten Institut die mitgeteilten Versuche angestellt. Mäusetyphusbacillen und Microc. tetragenus stammen aus dem Institut für Infektionskrankheiten.

Die Ausbeute des Roh-Tyrosins nach 3 Wochen im Brutschrank 0,41 g.

Nach Umkrystallisation aus siedendem Wasser unter Zusatz von Tierkohle 0,123 g. Die Substanz hat typisches Aussehen der Tyrosinkrystalle und zeigt Millonsche Reaktion. F. 295° (unkorr.).

Bei der Stickstoffanalyse nach Kjeldahl zeigte sie einen etwas höheren Stickstoffgehalt als theoretisch (0,72 % mehr).

Das Filtrat vom Glycyl-t-tyrosinversuch wurde wie bei dem oben beschriebenen Glycylglycinversuch behandelt und mit 1,7 g β-Naphthalinsulfochlorid gekuppelt. Ausbeute 0,49 g.

Nach Umkrystallisation aus heißem Wasser 0,11 g (entsprechend 0,03 g Glykokoll). F. 156° (unkorr.).

Zur Analyse im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,0914: $^n/_{10}$-NH_3 3,4 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,21

2. Glycylglycinversuch.

Ganz wie bei Typhusbacillen behandelt. 3 Wochen im Brutschrank.

Zuerst β-Naphthalinsulfoglycin 2,05 g (entsprechend 0,58 g Glykokoll). F. ca. 152° (unkorr.). Nach Umkrystallisation aus heißem Wasser 1,85 g. F. 156° (unkorr.).

Zur Analyse im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,1626: $^n/_{10}$-NH_3 6,20 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,34

III. Untersuchungen mit Paratyphus B-Bacillen.

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Der Beginn der Ausscheidung der Tyrosinkrystalle nach 5 Tagen. Die Ausbeute an Rohtyrosin nach 4 Wochen im Brutschrank 0,49 g. Nach Umkrystallisation aus siedendem Wasser unter Zusatz von Tierkohle 0,15 g. Durch Verarbeiten der Mutterlauge wurden noch 0,20 g erhalten.

Zur Analyse noch einmal umkrystallisiert und bei 100° getrocknet. F. 304° (unkorr.).

Subst. 0,0946: $^n/_{10}$-NH_3 5,2 ccm
$C_9H_{11}O_3N$ Ber.: N 7,74
Gef.: N 7,70

β-Naphthalinsulfoglycin aus dem Filtrat 0,41 g roh. Nach Umkrystallisation aus heißem Wasser 0,04 g (entsprechend 0,011 g Glykokoll). F. 156° (unkorr.). Diese reine Substanz erwies sich durch die Mischprobe als identisch mit dem aus Glykokoll „Kahlbaum" dargestellten β-Naphthalinsulfoglycin.

2. Glycylglycinversuch.

Ebenfalls 4 Wochen im Brutschrank.

Die erste Ausbeute von β-Naphthalinsulfoglycin 2,05 g (entsprechend 0,58 g Glykokoll). F. ca. 150° (unkorr.).

Nach der Umkrystallisation aus heißem Wasser 1,15 g. F. 156° (unkorr.).

Die zur Analyse im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure getrocknete Substanz:

Subst. 0,1739: $^n/_{10}$-NH_3 6,5 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,24

IV. Untersuchungen mit Bac. dysenterie-Shiga-Kruse.

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Der Beginn der Auskrystallisation des Tyrosins nach 9 Tagen. 4 Wochen im Brutschrank. Tyrosin roh 0,55 g.

Nach Umkrystallisation aus siedendem Wasser unter Zusatz von Tierkohle 0,31 g.

Zur Analyse ohne Zusatz von Tierkohle umkrystallisiert und bei 100° getrocknet. F. 304° (unkorr.).

Subst. 0,1592: $^n/_{10}$-NH_3 8,7 ccm
$C_9H_{11}O_3N$ Ber.: N 7,74
Gef.: N 7,66

Aus dem Filtrate mit β-Naphthalinsulfochlorid behandelt, 0,43 g. Nach Umkrystallisation reines β-Naphthalinsulfoglycin 0,7 g (entsprechend 0,02 g Glykokoll). F. 156° (unkorr.). Die Mischprobe erwies die Identität mit dem aus Glykokoll dargestellten β-Naphthalinsulfoglycin.

2. Glycylglycinversuch.

Im Brutschrank 4 Wochen. β-Naphthalinsulfoglycin 1,06 g (entsprechend 0,30 g Glykokoll). F. ca. 153° (unkorr.). Nach Umkrystallisation aus heißem Wasser 0,95 g. F. 156° (unkorr.).

Im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,1289: $^n/_{10}$-NH_3 4,9 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,33

V. Untersuchungen mit Bac. dysenterie-Flexner.

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Der Beginn der Auskrystallisation des Tyrosins nach 10 Tagen. Im Brutschrank 4 Wochen. Tyrosin roh 0,55 g. Nach Umkrystallisation unter Zusatz von Tierkohle aus siedendem Wasser 0,24 g.

Zur Analyse noch einmal umkrystallisiert aus siedendem Wasser ohne Zusatz von Tierkohle und bei 100° getrocknet. F. 303° (unkorr.).

Subst. 0,1318: $^n/_{10}$-NH_3 7,6 ccm
$C_9H_{11}O_3N$ Ber.: N 7,74
Gef.: N 8,08

Aus dem Filtrate:

β-Naphthalinsulfoglycin 0,50 g. Nach Umkrystallisation 0,15 g (entsprechend 0,042 g Glykokoll). F. 156° (unkorr.).

Im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,0587: $^n/_{10}$-NH_3 2,3 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,49

2. Glycylglycinversuch.

4 Wochen im Brutschrank.

β-Naphthalinsulfoglycin 1,05 g (entsprechend 0,30 g Glykokoll). F. ca. 153° (unkorr.). Nach Umkrystallisation aus heißem Wasser 0,92 g. F. 156° (unkorr.).

Zur Analyse im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,1410: $^n/_{10}$-NH_3 5,3 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,38
Gef.: N 5,27

VI. Untersuchungen mit Mäusetyphusbacillen.

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Der Beginn der Auskrystallisation des Tyrosins nach 10 Tagen. Im Brutschrank 3 Wochen.

Die ganze Flüssigkeit völlig dunkelbraun gefärbt. Tyrosinase! Tyrosin grau, etwas bräunlich, 0,24 g. Nach Umkrystallisation aus siedendem Wasser unter Zusatz von Tierkohle 0,07 g. Die Substanz ist ganz weiß, typisch auskrystallisiert und zeigt Millonsche Reaktion. Nach noch einmaliger Umkrystallisation aus siedendem Wasser schmolz sie, rasch erhitzt, bei 300° unter Zersetzung. Aus der Mutterlauge wurde, mit *β*-Naphthalinsulfochlorid behandelt, eine harzartige Masse, mit Krystallnadeln gemischt, ausgeschieden. Wir konnten davon isolieren: *β*-Naphthalinsulfoglycin 0,06 g (entsprechend 0,016 g Glykokoll). F. 156° (unkorr.).

2. Glycylglycinversuch.

β-Naphthalinsulfoglycin 1,93 g (entsprechend 0,55 g Glykokoll). F. ca. 150° (unkorr.). Nach Umkrystallisation aus siedendem Wasser 1,57 g. F. 156° (unkorr.). Im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,1368: $^n/_{10}$-NH_3 5,1 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,22

VII. Untersuchungen mit Hühnercholerabacillen.

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Nach einigen Tagen tritt bräunliche Färbung ein. Nach 8 Tagen spärliche Tyrosinkrystalle. Nach 4 Wochen ganz dunkelbraun gefärbt. Tyrosin roh (bräunlich gefärbt) 0,20 g. Nach Umkrystallisation aus

siedendem Wasser mit Tierkohle 0,02 g. Die Substanz ist ganz weiß, typische Krystalle. F. 296° (unkorr.). Wir waren nicht imstande, aus der Mutterlauge reines β-Naphthalinsulfoglycin zu isolieren.

2. Glycylglycinversuch.

4 Wochen im Brutschrank.

β-Napthalinsulfoglycin 1,51 g (entsprechend 0,43 g Glykokoll). F. ca. 152° (unkorr.). Nach Umkrystallisation 1,18 g. F. 156° (unkorr.). Zur Analyse im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,1674: $^n/_{10}$-NH_3 6,3 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,28

VIII. Untersuchungen mit Microc. tetragenus.

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Der Beginn der Auskrystallisation des Tyrosins nach 5 Tagen. 4 Wochen im Brutschrank. Die ganze Flüssigkeit ziemlich stark bräunlich. Tyrosin, fast ungefärbt, 0,48 g. Nach Umkrystallisation aus siedendem Wasser 0,25 g. Zur Analyse noch einmal umkrystallisiert aus siedendem Wasser und bei 100° getrocknet. F. 305° (unkorr.):

Subst. 0,1391: $^n/_{10}$-NH_3 7,7 ccm
$C_9H_{11}O_3N$ Ber.: N 7,74
Gef.: N 7,76

Aus der Mutterlauge:

β-Naphthalinsulfoglycin roh 0,42 g. Nach Umkrystallisation aus siedendem Wasser 0,10 g (entsprechend 0,03 g Glykokoll). F. ca. 152° (unkorr.). Die Substanz wurde noch einmal aus heißem Wasser umkrystallisiert, wog 0,04 g. Die Substanz fing an, bei ca. 149° zu sintern, schmolz bei ca. 155° total.

2. Glycylglycinversuch.

Ebenfalls 4 Wochen im Brutschrank.

β-Naphthalinsulfoglycin 2,37 g (entsprechend 0,67 g Glykokoll). F. ca. 155° (unkorr.). Nach Umkrystallisation 1,63 g. F. 156° (unkorr.). Zur Analyse im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,1882: $^n/_{10}$-NH_3 7,2 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,36

Die Kontrollversuche als Beweis, daß die oben geschilderte Manipulation allein niemals den hydrolytischen Abbau der Dipeptide hervorruft, habe ich schon in der I. Mitteilung beschrieben: Beim Glycyl-l-tyrosin fand ohne Bakterien, bei sonst jedoch ganz gleicher Behandlung, niemals Tyrosinausscheidung statt, und beim Glycylglycinversuch konnte ich unverändertes Glycylglycin, 61,9%, als β-Naphthalinsulfoverbindung

zurückgewinnen. (Originalangabe der Ausbeute von β-Naphthalinsulfoglycin aus salzsaurem Glycylglycin; 70% der Theorie nach E. Fischer und P. Bergell.)

Zusammenfassung.

Die nicht verflüssigenden Bakterien spalteten Glycyl-l-tyrosin und Glycylglycin hydrolytisch in ihre Komponenten Tyrosin und Glykokoll. Die Ausbeute war beträchtlich. Ausbeute an Rohtyrosin aus 1,0 g Glycyl-l-tyrosin 0,20 bis 0,55 g. Ausbeute an β-Naphthalinsulfoglycin aus 1,0 g Glycylglycin 1,05 bis 2,45 g (entsprechend 0,30 bis 0,69 g Glykokoll).

Aus den großen Ausbeuten an hydrolytischen Spaltungsprodukten darf man wohl ohne Bedenken den Schluß ziehen, daß es sich hier sicher um Wirkung erepsinartiger Enzyme handelt. Pepsinartige Enzymwirkung ist von vornherein ausgeschlossen, weil hier künstliche Dipeptide verwendet wurden. Trypsinartige Enzymwirkung ist wahrscheinlich ebenfalls außer Betracht zu lassen; denn einerseits greifen die nicht verflüssigenden Bakterien genuine Eiweißkörper nicht an, andererseits vermag Trypsin Glycylglycin nicht abzubauen. Es ist also experimentell exakt bewiesen, daß den Bakterien als einzelligen Wesen auch ein erepsinartiges Enzym zukommt, das sowohl in tierischen[1]) als auch in pflanzlichen[2]) Gewebszellen ubiquitär zu existieren scheint.

---

[1]) H. M. Vernon, Journ. of Physiol. **32**, 33 und **23**, 81, 1905.

[2]) Vines, Zit. nach Oppenheimer, Die Fermente, S. 176.

Über den Abbau einiger Polypeptide durch Bakterien.

III. Mitteilung.

Untersuchungen mit verflüssigenden Bakterien.

Von

Takaoki Sasaki.

(Aus dem Laboratorium des Kyoundo-Hospitals zu Tokio.)

(Eingegangen am 17. November 1912.)

Beim Studium des Abbaues von Glycyl-l-tyrosin und Glycylglycin durch Bakterien gelangten wir allmählich zu der Ansicht, daß die Eigenschaft, beide Dipeptide abzubauen, fast allen Bakterien zuzukommen scheint. Dies ist aber weiterhin gar nicht befremdend, denn mit der Zeit ist man mehr und mehr mit dem Vorkommen des erepsinartigen Zellenzyms sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Zellen[1]) bekannt geworden, so daß die Ubiquität desselben in den meisten Zellen sehr wahrscheinlich geworden ist. Wir haben in der ersten Mitteilung[2]) Untersuchungen mit Bact. coli commune und in der zweiten[3]) mit anderen nicht verflüssigenden Bakterien von Typhus, Paratyphus A und B, Dysenterie Flexner und Shiga-Kruse, Mäusetyphus, Hühnercholera, Micrococcus tetragenus mitgeteilt, indem wir bei allen Bakterien den hydrolytischen Abbau beider Dipeptide konstatieren konnten. Es war demnach wünschenswert, die Untersuchungen noch auf andere Gelatine verflüssigenden Bakterien auszudehnen, um festzustellen, daß auch die verflüssigenden Bakterien die Dipeptide zu hydrolysieren imstande sind. Wir haben deshalb mit 12 verflüssigenden Bakterien[4]) Experimente angestellt. Bei

---

[1]) Vgl. Oppenheimer, Die Fermente, Kap. X Peptasen.

[2]) Diese Zeitschr. 41, 174.

[3]) Diese Zeitschr. 47, 462.

[4]) Die Bakterien stammen teils aus dem Hygienischen Institut der Universität, teils aus dem Institut für Infektionskrankheiten zu Tokio.

allen konnten wir konstatieren, daß sie die Dipeptide hydrolytisch abzubauen vermögen.

Wenn man sich vergegenwärtigt, daß die normalen Faeces des Menschen zu etwa einem Drittel aus Bakterienleibern bestehen und täglich durchschnittlich mehr als 100 Billionen Mikroorganismen aus dem Körper eliminiert werden[1]), so muß man wohl zugeben, daß unsere Ergebnisse auch auf die Beurteilung physiologischer Probleme nicht ohne Einfluß bleiben können. Daß im Verdauungstractus verschiedenartige Mikroorganismen saprophytieren, ist schon lange bekannt. In neuerer Zeit wurden von L. M. Horowitz[2]) Untersuchungen über die Bakterien des Verdauungstractus, und zwar in verschiedenen Abschnitten, beim Hunde angestellt. Andererseits hat E. Abderhalden[3]) im Darminhalt verschiedener Tiere stets ziemliche Mengen von Aminosäuren nachgewiesen. Abderhalden und Kramm[4]) haben weiterhin zugunsten der Annahme eines möglichst vollständigen Abbaues der Proteine bis zu Aminosäure im Darmkanal folgende Tatsache angeführt:

Der Darminhalt vom Schweine erfährt bei Aufbewahrung im Brutschranke eine bedeutende Zunahme des Aminostickstoffes, so daß nach 6 Stunden bereits etwa $^2/_3$ derjenigen Aminostickstoffmenge vorhanden war, wie sie nach vollständiger Hydrolyse mit rauchender Salzsäure nachweisbar wäre. Daraus schließt er, daß im Darmkanal Bedingungen vorhanden sind, die einen raschen Abbau bis zu Aminosäuren gestatten.

Wir teilen unsere Ergebnisse mit in der Hoffnung, daß sie nicht nur für chemische Mikrobiologie, sondern auch für die Probleme des Abbaues der Proteine im Darmkanal einen kleinen Beitrag liefern mögen.

Hervorheben möchten wir ausdrücklich, daß durch unsere Ergebnisse die Abderhalden und Krammsche Arbeit an sich erschüttert wird, denn wie die Verfasser selbst mit Recht betonen, entfalten die Bakterien ebenfalls im Darmkanal ihre Wirksamkeit. Inwieweit und zu welchen Anteilen die eigentlichen Verdauungsenzyme und die Bakterienenzyme beteiligt

---

[1]) Vgl. D. Gerhardt, Über Darmfäulnis. Ergebnisse d. Physiol. 3, Heft 1, 107.

[2]) L. M. Horowitz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52, 95.

[3]) E. Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. 74, 436.

[4]) E. Abderhalden und Fr. Kramm, Zeitschr. f. physiol. Chem. 77, 425.

sind, muß allerdings noch weiterhin ermittelt werden. Experimentelle Schwierigkeiten dürften sich unserer Ansicht nach noch heute vielfach der Beantwortung in den Weg stellen. Beiläufig teilen wir kurz mit, daß auch dem abgetöteten Bacterium coli commune seine Fähigkeit, die Dipeptide abzubauen, innewohnt. Diesbezügliche nähere Mitteilungen und weiteres Studium über die Bakterienprotease hoffen wir in kurzer Zeit veröffentlichen zu können.

Experimenteller Teil.

Die experimentelle Methode habe ich schon in der I. und II. Mitteilung ausführlich beschrieben. Deshalb verzichte ich hier auf die Wiederholung derselben. Auf bakteriologische Reinheit wurden die einzelnen Proben sorgfältig kontrolliert. Es wurden stets Vorversuche angestellt, wobei wir das leichtlösliche Glycyl-l-tyrosin verwendeten. Aus der Mutterlauge nach der Filtration der ausgeschiedenen Tyrosinkrystalle das gespaltete Glykokoll als β-Naphthalinsulfoverbindung zu isolieren gelang uns nicht, indem dabei meist eine harzartige Masse zur Fällung kam, die auch nach vielfacher Umlösung nicht krystallisieren wollte. Bei der Bearbeitung mit nicht verflüssigenden Bakterien hat uns die Isolierung von Glykokoll aus der Mutterlauge keine sonderlich großen Schwierigkeiten bereitet. Die Versuchsdauer mit Glycylglycin haben wir meist derjenigen mit Glycyl-l-tyrosin gleichgestellt. Wenn dabei die Reindarstellung des β-Naphthalinsulfoglycins entweder durch Zurückbleiben des noch nicht abgebauten Glycylglycins oder infolge des zu weiten Fortschreitens der Zersetzung erschwert wurde, haben wir das Experiment mit einer anderen Versuchsdauer wiederholt.

I. Untersuchungen mit Milzbrandbacillen.

1. Glycin-l-tyrosinversuch.

1 g Glycyl-l-tyrosin ($C_{11}H_{14}N_2O_4 . H_2O$) in 25 ccm Fränkelscher Nährlösung, die mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht ist, wurde wie üblich in einem Erlenmeyerschen Kolben mit einem Wattepfropf sterilisiert, wobei es ganz in Lösung ging. Nach dem Erkalten wurde dann mit einer 24 Stunden alten Agarstrichkultur, in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, beschickt. Nach 3 Tagen ließ sich bereits Auskrystallisation des Tyrosins beobachten. Nach einer Woche wurde das Gemisch

sterilisiert, weil sich die Krystallisation nicht mehr zu vermehren schien, die Reinheit der Bakterienvegetation wurde kontrolliert; die Aufarbeitung erfolgte wie in der früheren Mitteilung angegeben.

Isoliert 0,38 g rohes Tyrosin.

Nach Umkrystallisation aus siedendem Wasser unter Zusatz von Tierkohle: 0,23 g.

Zur Analyse wurden die typischen Tyrosinkrystalle im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,1802: $^{n}/_{10}$-NH_3 9,9 ccm
$C_9H_{11}O_3N$ Ber.: N 7,74
Gef.: N 7,69

2. Glycylglycinversuch.

Im Brutschrank 4 Wochen. Die Methode der Verarbeitung ganz dieselbe wie die der früheren Mitteilung.

Aus 1 g Glycylglycin: β-Naphthalinsulfoglycin roh 3,07 g (entsprechend 0,87 g Glykokoll).

Nach Umkrystallisation 1,38 g. F. 156° (unkorr.).

Subst. 0,2238 g: $^{n}/_{10}$-NH_3 9,0 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,63

II. Untersuchungen mit Staphylococcus pyogenes aureus.

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Der Beginn der Auskrystallisation des Tyrosins schon nach 3 Tagen. Im Brutschrank 22 Tage.

Aus 1 g Glycyl-l-tyrosin: Tyrosin roh 0,48 g.

Nach der Umkrystallisation aus siedendem Wasser unter Zusatz von Tierkohle 0,27 g.

Zur Analyse die typisch auskrystallisierten Tyrosinkrystalle im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,2040 g: $^{n}/_{10}$-NH_3 11,2 ccm
$C_9H_{11}O_3N$ Ber.: N 7,74
Gef.: N 7,68

2. Glycylglycinversuch.

Im Brutschrank ebenfalls 22 Tage.

Aus 1 g Glycylglycin: 2,95 g β-Naphthalinsulfoglycin (entsprechend 0,83 g Glykokoll).

Nach der Umkrystallisation aus heißem Wasser 2,1 g. F. 155 bis 156° (unkorr.).

Im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,2474: $^{n}/_{10}$-NH_3 9,6 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,43

III. Untersuchungen mit Staphylococcus pyogenes citreus.

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Der Beginn der Auskrystallisation der Tyrosinkrystalle nach 5 Tagen. Im Brutofen 4 Wochen belassen.

Aus 1 g Glycyl-l-tyrosin: Tyrosin roh 0,53 g. Nach der Umkrystallisation aus siedendem Wasser unter Zusatz von Tierkohle 0,36 g.

Zur Analyse die typisch auskrystallisierten Tyrosinkrystalle im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,1494: $^n/_{10}$-NH_3 8,2 ccm
$C_9H_{11}O_3N$ Ber.: N 7,74
Gef.: N 7,68

2. Glycylglycinversuch.

Im Brutschrank ebenfalls 4 Wochen.

Aus 1 g Glycylglycin: β-Naphthalinsulfoglycin 2,07 (entsprechend 0,59 g Glykokoll).

Nach der Umkrystallisation aus heißem Wasser 1,67 g. F. 1,56° (unkorr.).

Zur Analyse im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,2141: $^n/_{10}$-NH_3 8,5 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,56

IV. Untersuchungen mit Staphylococcus pyogenes albus.

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Der Beginn der Auskrystallisation des Tyrosins erst nach 1 Woche. Aufenthalt im Brutschrank 4 Wochen.

Aus 1 g Glycyl-l-tyrosin: Tyrosin roh 0,25 g.

Nach Umkrystallisation aus siedendem Wasser unter Zusatz von Tierkohle 0,13 g.

Zur Analyse die typisch auskrystallisierten Tyrosinkrystalle im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,1414: $^n/_{10}$-NH_3 8,1 ccm
$C_9H_{11}O_3N$ Ber.: N 7,74
Gef.: N 8,02

2. Glycylglycinversuch.

Im Brutschrank ebenfalls 4 Wochen.

Aus 1 g Glycylglycin: β-Naphthalinsulfoglycin 2,6 g (entsprechend 0,74 g Glykokoll).

Nach der Umkrystallisation aus siedendem Wasser 1,82 g. F. 156° (unkorr.).

Zur Analyse im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,2340: $^{n}/_{10}$-NH_3 9,4 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,62

V. Untersuchungen mit Bacillus subtilis.

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Der Beginn der Auskrystallisation des Tyrosins schon nach 3 Tagen. Mehr und mehr verdunkelt sich die Nährflüssigkeit (Tyrosinase)[1]. Nach einer Woche haben wir die ganz dunkelbraune Flüssigkeit nach der Bestätigung der bakteriologischen Reinheit sterilisiert und weiter verarbeitet.

Aus 1 g Glycyl-l-tyrosin: Tyrosin roh, bräunlich 0,45 g.

Nach der Umkrystallisation aus siedendem Wasser unter Zusatz von Tierkohle 0,33 g.

Zur Analyse die ganz weißen typischen Tyrosinkrystalle im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,2208: $^{n}/_{10}$-NH_3 12,6 ccm
$C_9H_{11}O_3N$ Ber.: N 7,74
Gef.: N 7,68

2. Glycylglycinversuch.

Im Brutschrank 4 Wochen.

Aus 1 g Glycylglycin: β-Naphthalinsulfoglycin 2,77 g (entsprechend 0,78 g Glykokoll).

Nach der Umkrystallisation aus siedendem Wasser 1,08 g. F. 156° (unkorr.).

Zur Analyse im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,2398: $^{n}/_{10}$-NH_3 9,4 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,48

VI. Untersuchungen mit Bacillus proteus vulgaris.

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Hier trat die Tyrosinasewirkung noch energischer als bei Bacillus subtilis zutage. Ehe noch Tyrosinkrystalle zum Vorschein kamen, war schon in einigen Tagen die Gesamtflüssigkeit ganz dunkelbraun. Nach einer Woche wurden spärliche Tyrosinkrystalle bemerkbar.

Nach 3 Wochen im Brutschrank wogen die ausgeschiedenen rohen Tyrosinkrystalle 0,05 g (aus 1 g Glycyl-l-tyrosin).

---

[1]) D. Carbone, Bioch. Zentralbl. 4, 618. — E. Abderhalden und M. Guggenheim, Zeitschr. f. physiol. Chem. 54, 331.

2. Glycylglycinversuch.

Im Brutofen 3 Wochen.

Aus 1 g Glycylglycin: β-Naphthalinsulfoglycin 1,46 g (entsprechend 0,41 g Glykokoll).

Nach der Umkrystallisation aus siedendem Wasser 1,15 g. F. 156° (unkorr.).

Zur Analyse im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,3068: $^n/_{10}$-NH_3 11,8 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,38

VII. Untersuchungen mit Bacillus pyocyaneus.

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Bac. pyocyaneus besitzt auch energische Tyrosinasewirkung. Nach 3 Wochen wurde die gesamte Flüssigkeit ganz dunkelbraun.

Aus 1 g Glycyl-l-tyrosin: Tyrosin roh 0,28 g.

Zur Analyse im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,1552: $^n/_{10}$-NH_3 8,4 ccm
$C_9H_{11}O_3N$ Ber.: N 7,73
Gef.: N 7,58

2. Glycylglycinversuch.

Im Brutschrank 3 Wochen.

Zum Versuch wurde 1 g Glycylglycin verwendet.

Wir konnten unter Verwendung von β-Naphthalinsulfochlorid weder reines β-Naphthalinsulfoglycin noch β-Naphthalinsulfoglycylglycin isolieren.

Allerdings erhielten wir dabei 0,5 g Krystalle, die bei ca. 130° zusammensinterten und zwischen 135° bis 145° schmolzen. Sie bestanden offenbar aus unreinem β-Naphthalinsulfoglycin, aus dem wir leider durch wiederholte Umkrystallisation keine reine Substanz isolieren konnten. Dieser Glycylglycinversuch wurde noch einmal wiederholt, wobei sich das gleiche Resultat ergab.

VIII. Untersuchungen mit Bacillus prodigiosus.

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Der Beginn der Ausscheidung der Tyrosinkrystalle nach 6 Tagen.

Im Brutschrank 4 Wochen, die Gesamtflüssigkeit ziemlich stark dunkelbraun gefärbt.

Aus 1 g Glycyl-l-tyrosin: Tyrosin roh 0,46 g.

Nach der Umkrystallisation aus siedendem Wasser unter Zusatz von Tierkohle 0,27 g.

Zur Analyse wurden die typischen Tyrosinkrystalle im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,2006: $^n/_{10}$-NH_3 11,3 ccm
$C_9H_{11}O_3N$ Ber.: N 7,74
Gef.: N 7,89

2. Glycylglycinversuch.

Im Brutschrank 4 Wochen.

Aus 1 g Glycylglycin: β-Naphthalinsulfoglycin 1,4 g (entsprechend 0,40 g Glykokoll).

Nach der Umkrystallisation aus heißem Wasser 1,04 g. F. 156° (unkorr.).

Zur Analyse im Vakuumexiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,3450: $^n/_{10}$-NH_3 13,5 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,47

IX. Untersuchungen mit Vibrio cholerae.

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Der Beginn der Ausscheidung der Tyrosinkrystalle nach 3 Tagen.

Im Brutschrank 4 Wochen (dunkelbraun).

Aus 1 g Glycyl-l-tyrosin: Tyrosin roh 0,35 g.

Nach der Umkrystallisation aus siedendem Wasser unter Zusatz von Tierkohle 0,13 g.

Zur Analyse wurden die typischen Tyrosinkrystalle im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,1253: $^n/_{10}$-NH_3 6,9 ccm
$C_9H_{11}O_3N$ Ber.: N 7,34
Gef.: N 7,71

2. Glycylglycinversuch.

Im Brutschrank 4 Wochen.

Aus 1 g Glycylglycin: β-Naphthalinsulfoglycin 1,15 g (entsprechend 0,33 g Glykokoll).

Nach der Umkrystallisation aus heißem Wasser 0,05 g. F. 156° (unkorr.).

Zur Analyse im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,3506: $^n/_{10}$-NH_3 13,4 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,35

X. Untersuchungen mit Vibrio Metschnikoff.

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Der Beginn der Auskrystallisation des Tyrosins nach 8 Tagen.

Im Brutschrank 4 Wochen (dunkelbraun).

Aus 1 g Glycyl-l-tyrosin: Tyrosin roh 0,36 g.

Nach der Umkrystallisation aus siedendem Wasser unter Zusatz von Tierkohle 0,28 g.

Zur Analyse im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,2336: $^{n}/_{10}$-NH_3 12,6 ccm
$C_9H_{11}O_3N$ Ber.: N 7,74
Gef.: N 7,55

2. Glycylglycinversuch.

Im Brutschrank 4 Wochen.

Aus 1 g Glycylglycin: β-Naphthalinsulfoglycin roh 1,10 g (entsprechend 0,31 g Glykokoll).

Nach der einmaligen Umkrystallisation 0,56 g.

Zur Analyse wurde die Substanz noch einmal umkrystallisiert und im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet. Die Substanz schmolz immer noch bei etwas zu niedriger Temperatur ca. 153 bis 154° (unkorr.).

Die Analyse ergab für β-Naphthalinsulfoglycin beinahe stimmende Zahlen.

Subst. 0,2788: $^{n}/_{10}$-NH_3 11,4 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,72

XI. Untersuchungen mit einem Wasservibrio.

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Der Beginn der Auskrystallisation des Tyrosins nach 6 Tagen.

Im Brutschrank 1 Woche (dunkelbraun).

Aus 1 g Glycyl-l-tyrosin: Tyrosin roh 0,36 g.

Nach der Umkrystallisation aus siedendem Wasser unter Zusatz von Tierkohle 0,18 g.

Zur Analyse wurden die typischen Tyrosinkrystalle im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,1788: $^{n}/_{10}$-NH_3 9,6 ccm
$C_9H_{11}O_3N$ Ber.: N 7,74
Gef.: N 7,76

2. Glycylglycinversuch.

Im Brutschrank 1 Woche.

Aus 1 g Glycylglycin: β-Naphthalinsulfoglycin 1,06 g (entsprechend 0,30 g Glykokoll).

Nach der Umkrystallisation aus heißem Wasser 0,82 g. F. 156° (unkorr.).

Zur Analyse im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,2456: $^{n}/_{10}$-NH_3 9,3 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,30

XII. Untersuchungen mit Vibrio Dunbar.

1. Glycyl-l-tyrosinversuch.

Der Beginn der Ausscheidung der Tyrosinkrystalle nach 2 Tagen.

Im Brutschrank 1 Woche (dunkelbraun).

Aus 1 g Glycyl-l-tyrosin: Tyrosin roh 0,38 g.

Nach der Umkrystallisation aus siedendem Wasser unter Zusatz von Tierkohle 0,28 g.

Zur Analyse wurden die typischen Tyrosinkrystalle im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,2124: $^n/_{10}$-NH_3 11,6 ccm
$C_9H_{11}O_3N$ Ber.: N 7,74
Gef.: N 7,64

2. Glycylglycinversuch.

Im Brutschrank 3 Wochen.

Aus 1 g Glycylglycin: β-Naphthalinsulfoglycin 1,0 g (entsprechend 0,28 g Glykokoll).

Nach der Umkrystallisation aus heißem Wasser 0,83 g. F. 156° (unkorr.).

Zur Analyse im Vakuumexsiccator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet:

Subst. 0,2182: $^n/_{10}$-NH_3 8,2 ccm
$C_{12}H_{11}O_4SN$ Ber.: N 5,28
Gef.: N 5,26

Bei dieser Untersuchung haben Ichiro Otsuka und Teidji Shishido als Assistenten mitgewirkt.

Über das Verhältnis zwischen dem Aminstickstoff und dem Gesamtstickstoff im Harn unter verschiedenen normalen und pathologischen Bedingungen.

Von

Ernsto Signorelli.

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie der K. Universität Neapel.)

(Eingegangen am 4. Oktober 1912.)

Über das Schicksal der Aminosäuren im Organismus besitzen wir nunmehr sichere Kenntnisse. Sowohl die aus der Darmresorption stammenden, als die infolge autolytischer Vorgänge in den Geweben erzeugten und die auf künstlichem Wege in ein Tier eingeführten Aminosäuren werden zum großen Teil oxydiert und nur in kleiner Menge durch den Harn ausgeschieden. Ferner wissen wir sicher, daß je nach den Bedürfnissen der Gewebe ein Teil der Aminosäuren zur Wiederherstellung der lebenden Protoplasmen dient.

Die Schnelligkeit, mit der die Aminosäuren verbrannt werden, ist in der Tat sehr groß und vielleicht nicht geringer als die, mit der im Organismus Traubenzucker, Äthylalkohol usw. verbraucht werden. Infolgedessen können die Aminosäuren in gewissen Organismen den vorwiegend größten Teil der Energiequellen darstellen. Wie bekannt, verschwinden die in den Kreislauf eingeführten Aminosäuren sehr rasch, indem sie durch ihre Auflösung zur Bildung des Harnstoffes beitragen, während der Kohlenstoff und der Wasserstoff in CO_2 und H_2O übergeführt werden.

Auch scheint erwiesen zu sein, daß die Hauptstätte für die Zerstörung der Aminosäuren die Leber ist, wo infolge Einwirkung von aminolytischen Fermenten der bekannte erste Grad

der Spaltung, der Desamidierung, eintritt. Es bleiben aliphatische (ketonische) und aromatische Reste übrig, deren Schicksal noch ungewiß und strittig ist.

Nachdem man im allgemeinen erkannt hat, daß die Aminosäuren im Organismus rasch aufgebraucht und zerstört werden, muß jetzt noch in vergleichender Weise der Grad und die Schnelligkeit, mit der dies bei den verschiedenen Stoffen von diesem Typus geschieht, festgestellt werden. Auf die Lösung dieser Fragen konzentrieren sich jetzt die Anstrengungen der verschiedenen Forscher, und man sucht zu konstatieren, welche der aus der Spaltung der Eiweißkörper stammenden Aminosäuren leichter zerstört werden, ob die Produkte der durch Verdauungsfermente oder andere Katalysatoren verursachten Hydrolyse sich auf gleiche Weise verhalten, ob die Isomeren und speziell die beiden optischen Antipoden einer und derselben Aminosäure in gleicher Weise verbrannt werden können und ob der Organismus imstande ist, auch Aminosäuren, die nicht normalerweise in den Proteinen vorkommen, zu oxydieren.

Über alle diese Fragen wissen wir heutzutage noch sehr wenig.

Ein sehr interessanter Umstand besteht aber darin, daß ein kleiner Bruchteil der auf irgendeine Weise in den Kreislauf eintretenden Aminosäuren der Oxydation entgeht und in den Harn übergeht. Dieser Bruchteil schwankt bei den unter konstanten Bedingungen gehaltenen Tieren innerhalb sehr enger Grenzen, während er variiert, wenn die Mengen der in den Kreislauf eintretenden Aminosäuren variieren. Nun konnte ich aber bei meinen einleitenden Experimenten einen Parallelismus zwischen der Menge der mit dem Harn ausgeschiedenen Aminosäuren und der Menge des ebenfalls mit dem Harn ausgeschiedenen Gesamtstickstoffs konstatieren, weshalb es mir interessant erschien, das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$[1] (N_a = Menge des mit dem Harn in 24 Stunden ausgeschiedenen Aminstickstoffs, N_t = Menge des mit dem Harn in 24 Stunden aus-

[1]) Die Zahlen, die im Text dieser Arbeit den Wert des Verhältnisses $\frac{N_a}{N_t}$ repräsentieren, sind immer (auch wenn dies nicht ausdrücklich erwähnt wird) als mit 100 multipliziert zu verstehen.

geschiedenen Gesamtstickstoffs) unter verschiedenen Bedingungen des Organismus zu studieren, speziell unter den folgenden:

beim Hungern,
bei Zunahme der Oxydationsvorgänge,
bei verschiedener Ernährung,
nach subcutaner Injektion von Aminosäuren,
bei den das Fieber begleitenden Azoturien und
bei der Vergiftung durch Phosphor.

Zu meinen Experimenten habe ich nur Hunde verwendet, die bei konstanter Diät gehalten wurden. Diese Diät war ihrer Zusammensetzung nach in allen Experimenten die gleiche und bestand in Rindsdärmen, Brot und Fett. Die Menge dieser Nahrungsmittel wurde dem Gewicht jedes Tieres angepaßt.

Der Harn wurde alle 24 Stunden aufgefangen, und ich bestimmte seinen Gesamtstickstoff nach der Kjeldahlschen Methode, den Aminstickstoff nach der Methode Sörensen-Henriques und das Ammoniak nach der Methode Krüger-Schittenhelm.

Bei verschiedenen Experimenten wurde auch der Gesamtstickstoff der Faeces bestimmt, und auf diese Weise konnte die Gesamtbilanz des Stickstoffs festgestellt werden.

Ich habe es für zweckmäßig gehalten, auch die aus den Arbeiten anderer Forscher sich ergebenden Werte des Verhältnisses $\frac{N_a}{N_t}$ anzuführen, damit man diese Zahlen mit den von mir erhaltenen vergleichen kann. Deshalb bringe ich im Text meiner Arbeit Tabellen, die diese Zahlen und die sich aus meinen Untersuchungen ergebenden Werte von N_a, N_t und $\frac{N_a}{N_t}$ enthalten.

Dagegen wird man die Protokolle über meine Experimente am Ende der Arbeit finden; sie enthalten alle Zahlenangaben meiner Bestimmungen.

I. Das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ beim Hungern.

Von den Bestimmungen der Aminosäuren im Harn des hungernden Hundes sind die neuesten und die zahlreichsten die von Fuchs[1]); er hat sehr übereinstimmende Zahlen für das Verhältnis zwischen dem Aminstickstoff und dem Gesamtstickstoff gefunden, welche Zahlen nahe an 2 liegen.

[1]) D. Fuchs, Zeitschr. f. physiol. Chem. 69, 491.

Tabelle I.

Autor	N_t g	N_a g	$\frac{N_a}{N_t} \cdot 100$ g
Fuchs.			
Mittel von 19 Tagen	2,485	0,055	2,29
Buglia.			
1. Experiment	2,59	0,026	1,05
3. "	1,55	0,016	1,03
3. "	1,41	0,010	0,71
3. "	1,19	0,019	1,64
4. "	0,84	0,0084	1,00
Abderhalden und seine Mitarbeiter.			
1. Experiment. Mittel von 7 Tagen	2,995	0,044	1,11
2. Experiment. Mittel von 6 Tagen	4,675	0,067	1,43
5. Experiment. Mittel von 7 Tagen	2,192	0,049	2,33
7. Experiment. Mittel von 4 Tagen	2,046	0,043	2,15
13. Experiment. Mittel von 10 Tagen	3,452	0,070	2,04
15. Experiment. Mittel von 9 Tagen	5,044	0,071	1,42
Eigene Experimente.			
20. Experiment.	0,79	0,0112	1,41
	0,70	0,0100	1,42
	0,72	0,0112	1,55
	0,81	0,0123	1,51
Mittel	0,755	0,0111	1,48
19. Experiment.	0,86	0,0103	1,19
	0,80	0,0098	1,20
	1,14	0,0109	0,95
	1,37	0,0142	1,03
Mittel	1,04	0,0130	1,09
8. Experiment	0,833	0,0123	1,48
8. "	1,034	0,0134	1,30
7. "	0,781	0,0101	1,34
5. "	0,723	0,0106	1,46
9. "	1,209	0,0113	0,94
Mittel	0,916	0,0117	1,30

Weitere Zahlen habe ich einer Arbeit von Buglia[1]) entnommen über Hunde, die zu anderen experimentellen Zwecken im Hungerzustande

[1]) G. Buglia, Zeitschr. f. Biol. 57, 1911.

gehalten wurden. Diese Zahlen sind niedriger als die von Fuchs, denn sie liegen um 1 herum.

In ähnlicher Weise habe ich weitere Zahlen den Arbeiten von Abderhalden, Furno, Goebel und Strübel[1]) entnommen, die sich auf Hunde beziehen, die für Experimente im Hungerzustand gehalten wurden; auf diese Arbeiten werde ich später verweisen, da durch sie die Verwendung verschiedener Aminosäuren festgestellt wurde.

Endlich bringe ich in der vorstehenden Tabelle I auch die Zahlen, die ich bei einigen Hunden, die ich für andere Experimente hungern ieß[2]), erhalten habe.

Aus der Gesamtheit dieser verschiedenen Bestimmungen ersieht man, daß das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ bei hungernden Hunden zwischen 1 und 2 schwankt. Auch beim Hungern entgeht also ein Bruchteil von Aminosäuren, der sicher endogenen Ursprungs ist und aus der Desintegration der Eiweißkörper der Gewebe stammt, der Oxydation. Dieser Bruchteil hält sich innerhalb konstanter Grenzen im Verhältnis zu dem mit dem Harn ausgeschiedenen Gesamtstickstoff.

II. Das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ während der Schwankungen der Intensität der Oxydationsvorgänge.

Bei früheren Untersuchungen hatte ich[3]) die Hypothese aufgestellt, daß die Verminderung der Menge von Aminosäuren, die mit dem Harn ausgeschieden werden, wie sie während des Aufenthaltes im Hochgebirge eintritt, durch eine Zunahme der Oxydationsvorgänge bedingt sei.

In Anbetracht der leichten Oxydierbarkeit der Aminosäuren konnte man denken, daß bei Zunahme oder Abnahme der Verbrennungen in den Organen auch Veränderungen im Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ eintreten würden.

Diese Frage hat Manacorda[4]) behandelt, der die Veränderungen bei der Ausscheidung der Aminosäuren bei Hunden studiert hat, die er verschiedene Stunden lang in einem an Kohlensäureanhydrid reichen Medium hielt, damit die Intensität

---

[1]) Abderhalden, Furno, Goebel, Strübel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 74, 481.

[2]) Siehe auch die Tabellen VIII, IX, X.

[3]) E. Signorelli, diese Zeitschr. 31, 1912.

[4]) C. Manacorda, Lo Sperimentale 1912, Heft I.

der Oxydationen auf diese Weise vermindert würde. Unter diesen Bedingungen fand **Manacorda** eine Zunahme in der Ausscheidung der Aminosäuren im Vergleich mit den Zahlen, die dieser Autor mit den gleichen Methoden in langen Beobachtungsperioden erhielt, während welcher die Hunde bei konstanter Diät erhalten wurden.

Ich bringe die Werte $\frac{N_a}{N_t}$, die man der Tabelle **Manacordas** entnehmen kann, nicht, weil sie sich von den von mir und anderen Autoren als normale Daten erhaltenen sehr unterscheiden.

Ich habe die umgekehrte Erscheinung studiert, indem ich das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ bei einem Hunde bestimmte, den ich einige Stunden lang reinen Sauerstoff einatmen ließ. Der Hund, an dem drei Experimente gemacht wurden, wog 5,750 kg und zeigte während der ganzen Dauer des Experimentes keine bemerkenswerten Gewichtsveränderungen. Seine Temperatur erhielt sich normal. Er wurde bei konstanter Diät, wie gewöhnlich, gehalten, und es wurden während der beiden ersten Experimente in 24 Stunden 3,85 g N eingeführt, während des dritten Experimentes 4,2 g.

Bei Beginn des Experimentes wurde an der Schnauze des Tieres eine kleine Marke angebracht, die mit einem **Zuntz**schen Klappenapparat in Verbindung stand. Letzterer war seinerseits mit einem großen Gummiballon verbunden, der mit Sauerstoff gefüllt war.

Die Resultate dieser drei Experimente findet man in der am Ende der Arbeit beigefügten Tabelle VII; auf ihr sind die Zahlen zusammengestellt, die sich auf den Harn der einem jeden Experiment mit Sauerstoffinhalation vorausgehenden Tage und der Experimenttage beziehen; ferner enthält sie die Zahlen der Stickstoffbilanz.

In umstehender Tabelle II resümiere ich nur die Endresultate dieser Experimente.

Von diesen drei Experimenten müssen die beiden letzten am meisten in Betracht gezogen werden, weil beim ersten das Tier eine viel geringere Menge Sauerstoff einatmete und mit einem Klappenapparat, dessen Röhren vielleicht zu enge für

eine genügende Lungenventilation waren, weshalb der Hund zuweilen Anfälle von Dyspnoe hatte.

Tabelle II.

Nr. des Exper.	Bedingungen des Experimentes	N_t	N_a	$\frac{N_a}{N_t} \cdot 100$	Stickstoff-bilanz
1	Der Hund atmet atmosphärische Luft ein . .	2,90	0,0363	1,2	+ 0,48
	Der Hund atmet 300 l Sauerstoff in 3 Std. ein	2,86	0,0700	2,4	+ 0,59
2	Der Hund atmet atmosphärische Luft ein . .	3,55	0,0382	1,08	+ 0,07
	Der Hund atmet 800 l Sauerstoff in 7 Std. ein	3,93	0,0414	1,04	− 1,31
3	Der Hund atmet atmosphärische Luft ein . .	3,75	0,0820	2,2	+ 0,04
	Der Hund atmet 800 l Sauerstoff in 6 Std. ein	3,98	0,0945	2,37	− 0,18

Man sieht, daß ein Überschuß an Sauerstoff eine leichte Zunahme der Stickstoffausscheidung auf dem Harnwege verursacht, die einem Defizit infolge Verlustes von Stickstoff entspricht, was sich als Folge einer lebhafteren Oxydation von Proteinen des Organismus erklären läßt. Gleichzeitig nimmt aber auch die Ausscheidung der im Harn enthaltenen Aminosäuren zu und folglich das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$, wenigstens variiert es bei den beiden letzten Experimenten gar nicht.

III. Das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ bei verschiedener Ernährungsweise.

In der Voraussetzung, daß die Ausscheidung der Aminosäuren mit dem Harn je nach der bei den Versuchstieren eingeführten Nahrung beträchtlich verschieden sein kann, wurden drei Gruppen von Versuchen angestellt; die Hunde wurden nämlich mit Fleischnahrung im Überfluß, mit Pflanzeneiweißstoffen und mit isolierten Aminosäuren gefüttert.

Bezüglich der beiden ersten Versuchsgruppen will ich hier die Arbeit von Sörensen und Henriques[1]) anführen, die Hunde mit Fleisch bis zu einer täglichen Ausscheiduug von 14 bis 15 g N fütterten, dann nur mit Brot, so daß die Exkretion des Stickstoffs mit dem Harn auf 3 bis

[1]) Henriques und Sörensen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 60, 1909.

5 g reduziert wurde. Die Zahlen für das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$, die ich der Arbeit der genannten Autoren entnommen habe, finden sich in der folgenden Tabelle.

Ferner ist an die zahlreichen Arbeiten von Abderhalden und seinen Mitarbeitern über die Ernährung der Hunde mit den einzelnen Aminosäuren, die allein oder mit Kohlenhydraten und Fetten dargereicht wurden, zu erinnern. Meine Untersuchungen endlich habe ich mit vier verschiedenen Eiweißstoffen angestellt, zwei vegetabilischen, dem Zein des Mais und dem Glutin des Korns, zwei animalischen, der Gelatine und dem Casein. Wie bekannt, enthalten zwei von diesen vier Eiweißstoffen alle zum Stoffwechsel der Organe nötigen Gruppen, d. h. sie sind für die Ernährung vollkommen ausreichende Proteine, nämlich das Casein und das Glutin, während die beiden anderen, das Zein und die Gelatine, nicht alle Gruppen enthalten und deshalb nicht für die Assimilation genügen [siehe auch die jüngst erschienene Arbeit von Mc Callum[1])].

Die Hunde (4., 5., 6. und 7. Experiment) mußten 2 Tage hungern; dann wurde ihnen Nahrung gereicht, die den gewählten Eiweißstoff in überwiegendem Maße und in solcher Menge enthielt, daß täglich 2,3 bis 3 g N eingeführt wurden. Ferner erhielten die Tiere täglich 20 g Fett. Beim 4. Experiment wurde dem betreffenden Hunde ein besonderer Neapler Käse („Mozzarella“) dargereicht, der fast ausschließlich aus Casein besteht und 22% N enthält (De Giaxa).

Beim 5. Experiment erhielt der Hund die gewöhnlich zu bakteriologischen Zwecken verwendete Gelatine.

Beim 6. Experiment erhielt der Hund einen Brei, der 45% Glutin enthielt.

Beim 7. Experiment mit dem Zein erhielt der Hund Maisbrot.

Der Harn wurde, wie gewöhnlich, von 24 Stunden zu 24 Stunden aufgefangen.

Die experimentellen Daten finden sich in der Tabelle VIII am Ende der Arbeit. Hier will ich nur die endgültigen Zahlen anführen, die sich auf das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ beziehen; zum Vergleich schicke ich die Zahlen voraus, die ich den obenerwähnten Arbeiten von Sörensen und Henriques, Abderhalden und seinen Mitarbeitern entnommen habe.

---

1) Mc Callum, Amer. Journ. of Physiol. 29, 215, 1912.

Tabelle III.

Autoren	Ernährung	N_t	N_a	$\frac{N_a}{N_t} \cdot 100$
Abderhalden u. seine Mitarbeiter	Glykokoll, Zucker und Fett	von 2,2 bis 5,9	von 0,2 bis 1,0	von 9,8 bis 46,1
"	Alanin, Zucker und Fett	von 2,2 bis 2,6	von 0,1 bis 0,5	von 4,0 bis 23,0
"	Glutaminsäure, Zucker und Fett	von 1,9 bis 4,6	von 0,07 bis 0,14	von 1,3 bis 6,6
"	Asparaginsäure, Zucker und Fett	von 2,7 bis 4,1	von 0,03 bis 0,11	von 1,2 bis 3,3
"	Histidin, Zucker und Fett	von 3,4 bis 6,1	von 0,05 bis 0,23	von 1,5 bis 6,2
"	Alanin, Tyrosin, Cystin, Zucker u. Fett	4,8	0,07	1,5
Buglia 1. Experiment	Fleisch	0,978	0,016	1,64
	Produkte der künstlichen Fleischverdauung	1,126	0,026	2,33
	Fleisch	1,041	0,017	1,68
	Produkte der künstlichen Fleischverdauung	1,111	0,025	2,32
	Fleisch	0,949	0,016	1,71
2. Experiment	Gemischte Kost mit Fleisch	0,432	0,011	2,58
	Gemischte Kost mit Verdauungsprodukten . . .	0,453	0,011	2,53
	Gemischte Kost mit Fleisch	0,415	0,009	2,24
Sörensen und Henriques	Ernährung m. Fleisch (Mittel aus 3 Bestimmungen) . .	14,7	0,17	1,2
	Ernährung nur mit Brot (Mittel aus 12 Bestimmungen)	4,6	0,06	1,3
Eigene Experimente 4. Experiment	Casein (Mittel von 3 Tagen)	1,602	0,019	1,23
5. Experiment	Gelatine (Mittel von 3 Tagen)	2,72	0,033	1,14
6. Experiment	Glutin (Mittel von 3 Tagen)	2,89	0,023	0,75
7. Experiment	Zein (Mittel von 3 Tagen)	2,23	0,025	1,17

Hinsichtlich des Verhältnisses $\frac{N_a}{N_t}$ stimmen die Resultate von Sörensen und Henriques vollständig mit den meinigen überein.

Wie man sieht, variiert dieses Verhältnis nicht, trotz der verschiedenen Ernährungsweise, und immer geht also, welches auch die Menge der absorbierten Aminosäuren und die Beschaffenheit des Proteins, von dem sie stammen, sein mag, derselbe aliquote Bruchteil von ihnen in den Harn über. Besonders illustrativ sind die Daten von Sörensen und Henriques, aus denen man ersieht, daß der Quotient $\frac{N_a}{N_t}$ konstant zwischen 1,3 und 1,2 bleibt, auch wenn die Menge des eingeführten N von 4,6 g auf 14,7 g steigt.

Was die interessanten Untersuchungen von Abderhalden und seinen Mitarbeitern über die Ernährung von Hunden mit verschiedenen Aminosäuren betrifft, will ich noch bemerken, daß bisweilen, trotz der Absorption einer bestimmten Aminosäure, der Quotient $\frac{N_a}{N_t}$ nicht von der gewöhnlich von mir gefundenen Zahl abweicht, dagegen zu anderen Malen viel größere und auch sehr große Werte sich ergeben, wenn die Hunde mit Glykokoll oder Alanin ernährt wurden.

IV. Das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ nach der Einführung von Aminosäuren auf dem parenteralen Wege.

Verschiedene Autoren haben das Verhalten der auf dem parenteralen Wege eingeführten Aminosäuren studiert.

Öfter ist die Möglichkeit einer Verwertung behauptet, aber nur für den Fall, daß man einem Tiere ein aus der hydrolytischen Spaltung des Albumins mittels proteolytischer Fermente stammendes Gemisch injiziert. Auf andere Weise erhaltene Aminosäuren, auf synthetischem Wege erhaltene Isomere (Wohlgemuth) sind weniger leicht verwendbar, oder sie sind es gar nicht und gehen in den Harn über.

Stolte[1]) injizierte Glykokoll, Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylalanin, Tyrosin, Leucin in die Venen von Kaninchen und bemerkte, daß die aromatischen Aminosäuren keine Vermehrung des Harnstoffs verursachen. Die Asparaginsäure, die Glutaminsäure und das Alanin verursachen Zunahme des Harnstoffs und werden zum Teil als solche ausgeschieden.

---

[1]) Stolte, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 5, 15, 1904.

Das Glykokoll und das Leucin wandeln sich vollständig in Harnstoff um.

Salaskin und Kowalewski[1]) sahen, daß das Glykokoll, wenn es beim Hunde eingeführt wird, nur zum geringen Teil auf dem Nierenwege ausgeschieden wird, dagegen zum großen Teil desamidiert wird, weshalb eine Zunahme des Ammoniaks im Blute eintritt.

Abderhalden, Gigon und London[2]) injizierten Alanin in die Venen von Hunden und konstatierten eine Zunahme dieser Aminosäure im Blute und Harn der Tiere.

Roger[3]) nimmt an, daß die bei einem Tiere injizierten Aminosäuren sich als unschädlich erweisen, wenn sie durch Hydrolyse vermittelst Säuren erzeugt sind, dagegen Erniedrigung des Blutdruckes bewirken, wenn sie durch Pankreasverdauung erzeugt sind.

Wolf[4]) konstatierte bei ähnlichen Experimenten Erniedrigung des Blutdruckes, Hypoleukocytose und Ungerinnbarkeit des Blutes.

Untersuchungen über dieses Thema aus neuester Zeit sind die von Buglia[5]). Er injizierte in die Venen der Hunde abiuretische Produkte einer langen Fleischverdauung mittels Pankreasextrakt. Nach Injektion beträchtlicher Mengen dieser Hydrolysate beobachtete er bei den Tieren vorübergehende Störungen, von denen die hervortretendsten Diarrhöe und ein gewisser Grad von Albuminurie waren. Buglia schließt, wie schon andere Forscher vor ihm geschlossen hatten, daß die in den Kreislauf eingeführten Aminosäuren rasch verbrannt werden und daß nur ein kleiner Teil der Oxydation entgeht und mit dem Harn ausgeschieden wird.

Aus den Zahlen einiger Experimente Buglias habe ich das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ berechnet, wie es sich aus der folgenden Tabelle ergibt.

Ich muß jedoch bemerken, daß ich von Buglias Zahlen diejenigen ausgewählt habe, die sich auf den nach Beendigung der Injektion der Hydrolysate ausgeschiedenen Harn beziehen, weil die Zahlen für den während der Injektion aufgefangenen

---

[1]) Salaskin und Kowalewski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 47, 140, 1904.

[2]) Abderhalden, Gigon und London, Zeitschr. f. physiol. Chem. 53, 113.

[3]) Roger, Compt. rend. Soc. Biol. 66, 682, 1909. Digestion et nutrition Masson, Paris S. 504, 1910.

[4]) Wolf, Journ. de Physiol. et de Pathol. génér. 9, 925, 1907.

[5]) Buglia, Zeitschr. f. Biol. 58, 1912.

Harn natürlich einen zu reichen Gehalt an Aminosäuren aufwiesen. Bei direkter Einführung dieser Stoffe in die Venen enthielt dann das Blut sie in zu großer Konzentration, weshalb die Nieren sich beeilten, den Überschuß daran auszuscheiden, ehe die Vorgänge der Desamidierung und Verbrennung der Aminosäuren in ihrer normalen Intensität festgestellt werden konnten. Aus diesem Grunde habe ich das zweite Experiment Buglias nicht berücksichtigt, bei dem kein Unterschied gemacht wird zwischen dem während und dem nach der Injektion aufgefangenen Harn. Bei meinen Experimenten dagegen gestattete die subcutane Injektion ein langsameres Eindringen der Aminosäuren in den Strom des Kreislaufes.

Bei diesen Experimenten verwendete ich Hydrolysate von Gelatine, Casein und Zein. Das Gelatinehydrolysat wurde mit Schwefelsäure hergestellt, die dann mit einem Überschuß von Baryt entfernt wurde; das Baryt wurde mit CO_2 gefällt. Auf diese Weise erhielt ich eine Flüssigkeit ohne Sulfate und BaO, die in 100 ccm enthielt:

Gesamtstickstoff . . 1,700 g
Aminstickstoff . . . 0,870 g
NH_3 . . . . 0,028 g

Alle 100 ccm wurden subcutan einem Hunde injiziert, der Erscheinungen von Parese, Erbrechen und Diarrhöe zeigte.

Der Harn des Tages, an dem die Injektion erfolgte, und der des folgenden Tages wurden aufgefangen.

Das Zeinhydrolysat wurde mit konzentrierter HCl vermittelst eines 30stündigen Kochens erhalten. Die Salzsäure ließ ich bei niedrigem Drucke verdunsten und neutralisierte dann die Flüssigkeit; 100 ccm dieser Flüssigkeit, die einem Hunde subcutan injiziert wurden, enthielten:

Gesamtstickstoff . . 0,242 g
Aminstickstoff . . . 0,221 g

Das Caseinhydrolysat wurde auf gleiche Weise erhalten; 100 ccm dieser Flüssigkeit, die einem Hunde subcutan injiziert wurden, enthielten:

Gesamtstickstoff . . . 1,20 g
Aminstickstoff . . . 0,85 g

Auch diese Hunde zeigten die nämlichen obenerwähnten Krankheitserscheinungen, und der Hund, dem Caseinhydrolysat injiziert worden war, starb 24 Stunden nach der Injektion.

Die experimentellen Daten sind, wie gewöhnlich, in der Tabelle IX am Ende der Arbeit zu finden.

Hier bringe ich die Zahlen, die sich auf das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ beziehen.

Tabelle IV.

Autor und Nr. der Experimente	Den Hunden injizierte Stoffe	N_t	N_a	$\frac{N_a}{N_t} \cdot 100$
Buglia.				
1. Exper. . . .	Pankreashydrolysate	3,589	0,029	0,81
3. " . . .	idem	1,987	0,033	1,66
4. " . . .	idem	4,319	0,055	1,27
Eigene Experimente.				
8. Exper. . . .	Gelatinehydrolysat	4,34	0,065	1,51
9. " . . .	Zeinhydrolysat	2,73	0,0414	1,54
10. " . . .	Caseinhydrolysat	4,228	0,070	1,67

Aus meinen Experimenten ergibt sich also eine fast vollständige Gleichheit des Verhältnisses $\frac{N_a}{N_t}$, trotz der Verschiedenheit des unter die Haut des Tieres eingeführten Hydrolysates. Der Wert dieses Verhältnisses unterscheidet sich nicht sehr von den Werten der der Injektion vorausgehenden Tage, obschon der ausgeschiedene Gesamtstickstoff und der ausgeschiedene Aminstickstoff sehr zunehmen. So z. B. zeigt sich beim 9. Experiment:

	N_t	N_a	$\frac{N_a}{N_t} \cdot 100$
an dem der Injektion vorausgehenden Tage	1,03	0,013	1,3
am Tage der Injektion . . .	2,73	0,041	1,5

Infolge der Injektion verdreifachen sich also beinahe die Mengen des Gesamtstickstoffs und des ausgeschiedenen Aminstickstoffs, während das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ nicht variiert; dies bedeutet, daß es immer derselbe aliquote Teil der gerade im Kreislauf befindlichen Aminosäuren ist, der auf dem Nierenwege ausgeschieden wird.

V. Das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ bei Azoturien.

Bei dieser letzten Gruppe von Experimenten wollte ich das Verhalten des Verhältnisses $\frac{N_a}{N_t}$ in einigen Krankheitszuständen feststellen, in denen die Stickstoffbildung sicher Verluste erleidet, weil Faktoren, die Spaltungen der Eiweißkörper verursachen, sich einmischen.

In diesen Fällen tritt sicher eine endogene Bildung von Aminosäuren ein, und es ist interessant zu untersuchen, in welchem Maße diese Aminosäuren der Oxydation entgehen und durch den Harn ausgeschieden werden.

Bezüglich dieser Frage verweise ich auf einige alte Arbeiten, die ausgeführt wurden, als man noch keine sicheren Methoden zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren im Harn kannte. Deshalb konnte ich diesen Arbeiten keine auf das oben besprochene Verhältnis sich beziehende Zahlenangabe entnehmen. Krehl und Schulteß[1]) konstatierten das Vorhandensein von Eiweißderivaten (Albumosen, Peptone, Aminosäuren) im Harn bei vielen ansteckenden Krankheiten und Infektionen. Linser und Smith[2]) sahen, daß auch bei den künstlichen Hyperthermien der Wert des Aminstickstoffs des Harns zunimmt. Ferner wurden in vielen von Azoturie begleiteten klinischen Fällen die Aminosäuren des Harns bestimmt, bald mit der Methode Fischer-Bergell, bald mit der Methode von Embden. Auf diese Weise studierte Jacksch[3]) verschiedene Fälle von Diabetes mellitus und insipidus, Abderhalden[4]) einen Fall von Diabetes mit Arteriosklerose, Satta[5]) ebenfalls einen Fall von Diabetes, Ignatowski[6]), Lipstein und Feßner[7]) verschiedene Fälle von Gicht. Aber es ist nicht zulässig, aus diesen klinischen Untersuchungen irgendeinen allgemeinen und endgültigen Schluß zu ziehen. Sicherer sind die Resultate bezüglich der Krankheiten mit Läsionen der Leber, namentlich wenn Zelldegenerationen in diesem Organ vorhanden sind. Man nimmt allgemein an, daß in diesen Fällen zwei Gründe für das Auftreten der Aminosäuren im Harn vorliegen: erstens die Abnahme und das Verschwinden der desamidierenden Funktion der Leber und zweitens die endogene Produktion von Aminosäuren infolge der Zersetzung der Leberproteine.

---

[1]) Krehl und Schulteß, Arch. f. klin. Med. 58, 325.

[2]) Linser und Smith, Arch. f. klin. Med. 79, 514.

[3]) Jacksch, Arch. f. klin. Med. 50, 167, 1903.

[4]) Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 40, 1905.

[5]) Satta, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6, 358, 1905.

[6]) Ignatowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 371, 1904.

[7]) Lipstein und Feßner, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 7, 527, 1905.

Schon lange hat Frerichs[1]) die Anwesenheit von Leucin und Tyrosin im Harn als ein Zeichen von Insuffizienz der Leber betrachtet; er fand im Harn erhebliche Mengen dieser Stoffe in Fällen von Phosphorvergiftung oder von gelber akuter Atrophie der Leber, ebenso später Neuberg und Richter.

Diese Resultate wurden von Schulteß und von Rieß[2]) bestätigt. Jastrowitz[3]) fand bei Leberkranken, daß das eingeführte Glykokoll nicht vollständig zerstört wird, sondern zum Teil in den Harn übergeht. Van Leersum[4]) hat beobachtet, daß während der Schwangerschaft, vor und nach der Geburt eine Zunahme in der Ausscheidung der Aminosäuren durch den Harn eintritt, was er der Leberinsuffizienz zuschreibt, die man bei Schwangeren oder Wöchnerinnen beobachtet. Abderhalden und Schittenhelm[5]) konstatierten Aminoacidurie bei einer großen Zahl von Leberaffektionen. Wie man also sieht, stimmen die Resultate der verschiedenen Autoren hinsichtlich der Bedeutung der Leber für das Schicksal der Aminosäuren sehr überein, und diese Schlußfolgerung wird auch bestätigt durch die modernen Experimente über die künstliche Durchblutung der Leber mit Blut, dem Aminosäuren zugesetzt sind [Salaskin, Lambling[6])].

Eine Arbeit aus jüngster Zeit, die ich auch zitieren muß, ist die von Joshiwara[7]), der den Einfluß des Phlorizins auf die Ausscheidung des Stickstoffs studierte, indem er die wichtigsten Bruchteile des letzteren, die sich im Harn vorfinden, nämlich die des Harnstoffs, der Aminosäuren und des Ammoniaks, berücksichtigte.

Dieser Autor bestätigte einige frühere Untersuchungen, die schon nachgewiesen hatten, daß Phlorizinvergiftung bei Kaninchen Azoturie hervorruft. Er gelangt zur Schlußfolgerung, daß eine Zunahme in den mit Formol titrierbaren Stoffen eintritt, und daß diese Zunahme nicht nur in absolutem Sinne, sondern auch bezüglich des Gesamtstickstoffs erfolgt.

Meine Experimente können in verschiedene Gruppen eingeteilt werden, je nach den Mitteln, die zur Erzeugung der Azoturie und des Fiebers angewendet wurden. Außerdem werde ich noch einen Fall von spontanem Fieber mitteilen, das bei einem dem Experiment unterzogenen Hunde sich zeigte.

Zur Erzeugung des Fiebers und der Azoturie verwendete ich Injektionen von großen Mengen physiologischer Lösung, das Toxin des Streptokokkus, das Nucleoproteid des Pestbacillus, die

---

1) Frerichs, Arch. f. Anat. u. Physiol. 1854, 324.
2) Schulteß und Rieß, Alte Charité-Ann. 15, 2021.
3) Jastrowitz, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 59, 463.
4) Van Leersum, diese Zeitschr. 11, 121.
5) Abderhalden und Schittenhelm, Zeitschr. f. physiol. Chem. 47, 339.
6) Lambling, Révue Générale d. Sc. 1909, 185.
7) Joshiwara, Zeitschr. f. physiol. Chem. 74.

Benzoesäure und das Natriumbenzoat. Bei diesen Experimenten wurden die Hunde bei konstanter Diät gehalten, aber mit dem Nucleoproteid des Pestbacillus machte ich auch zwei Experimente an hungernden Hunden, um zu sehen, wie sich das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ im Fieber verhält, wenn der ganze ausgeschiedene N endogenen Ursprungs ist.

Endlich betreffen zwei Experimente die bei Phosphorvergiftung eintretende, von schwerer Insuffizienz der Leber begleitete Azoturie.

Die vollständigen Daten dieser Experimente finden sich auf S. 505 (Tab. X); hier stelle ich, wie gewöhnlich, die wichtigsten dieser Daten in der folgenden Tabelle zusammen:

Tabelle V.

Experimentelle Bedingungen	Höchste Temp. des Tieres °C	Überschuß der Ausscheidung des N im Vergleich zum normalen Mittel	N_t	N_a	$\frac{N_a}{N_t} \cdot 100$
11. Spontanes Fieber	40,6	1,24	4,06	0,134	3,00
12. Fieber infolge physiol. Lösung .	40,03	1,13	4,10	0,061	1,5
13. idem	39,8	0,82	3,90	0,039	1,0
14. idem	39,0	0,69	3,91	0,081	1,1
15. Fieber nach Streptokokkentoxin .	39,6	0,49	4,38	0,064	1,7
16. Fieber nach Nucleoproteid des Pestbacillus . .	40,9	0,57	4,45	0,120	2,55
17. idem	39,4	0,32	3,72	0,054	1,4
18. idem	39,5	2,74	5,84	0,078	1,33
19. Fieber nach Nucleoproteid des Pestbacillus beim hungernden Hund	39,8	1,49	2,42	0,028	1,16
20. idem idem . . .	39,8	0,30	1,05	0,016	1,60
21. Fieber nach Benzoesäure	39,5	0,77	3,92	0,078	1,98
22. Fieber nach Na-Benzoat	40,0	1,08	4,55	0,046	1,01

Aus den Tabellen V und VI ersieht man, daß beim Fieber das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ gewöhnlich zwischen 1 und 2 schwankt, obwohl die Gesamtmenge der Aminosäuren im Harn im Vergleich zu den normalen Mitteln gesunder Tiere etwas erhöht ist und zuweilen eine so beträchtliche Azoturie vorhanden ist, daß die

Tabelle VI.

Das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ in den letzten Lebenstagen bei mit Phosphor vergifteten Hunden.

Nr. des Exper.	N_t	N_a	$\frac{N_a}{N_t} \cdot 100$	Bemerkungen
23	3,63	0,048	1,33	
	3,22	0,117	3,66	
	2,45	0,048	2,00	Hungern und Tod des Tieres
24	2,52	0,075	2,85	
	3,03	0,092	3,04	
	4,38	0,073	1,64	

Gesamtmenge des ausgeschiedenen Stickstoffs bis aufs Doppelte erhöht ist (18. Experiment).

Besonders ist auf das 19. und 20. Experiment hinzuweisen, in denen das Fieber bei hungernden Tieren erzeugt wurde, bei denen also die stärkste Azoturie ganz auf Kosten der Eiweißkörper der Gewebe vorhanden war; auch bei diesen Tieren wurde der gewöhnliche Bruchteil der Aminosäuren endogenen Ursprungs mit dem Harn ausgeschieden und das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ erhob sich nicht über die gewohnten Grenzen.

Bei Phosphorvergiftung zeigt sich während der letzten Lebenstage der Tiere eine Erhöhung des Quotienten $\frac{N_a}{N_t}$, die wahrscheinlich durch eine ungenügende desamidierende Funktion der Leber zu erklären ist.

Unter Berücksichtigung meiner experimentellen Resultate und derjenigen der obenerwähnten Autoren kann man die folgenden kurzen Überlegungen über die Bedeutung des Verhältnisses $\frac{N_a}{N_t}$ anstellen.

Wie wir gesehen haben, zeigt sich in der Mehrzahl der Fälle bei Hunden eine gewisse Konstanz in den Zahlen, die den obigen Quotienten darstellen, da diese Zahlen die Grenze 1 bis 2 überschreiten.

Dies bedeutet, wie ich schon wiederholt bemerkte, daß stets derselbe aliquote Teil der Aminosäuren, die im Organismus erzeugt werden, der Oxydation entgeht und mit dem Harn ausgeschieden wird, und zwar sowohl wenn die Einführung der

Aminosäuren in den Kreislauf unbedeutend als wenn sie sehr groß ist, sowohl wenn die Stickstoffausscheidung auf die kleinste Grenze reduziert ist, wie beim Hungern, als wenn sie bis zur beträchtlichen Zahl von 14 bis 15 g steigt, wie dies nach reichlicher Fleischernährung der Fall ist (Sörensen und Henriques).

Und so entstehen auch keine beträchtlichen Schwankungen im Wert des Verhältnisses $\frac{N_a}{N_t}$, welches auch der Ursprung der Aminosäuren und die Art ihres Eintretens in den Kreislauf sein mag, d. h. das Verhältuis $\frac{N_a}{N_t}$ bleibt in den gewöhnlichen Grenzen, sowohl wenn es sich um Aminosäuren handelt, die von tierischen oder pflanzlichen Proteinen stammen, von vollständigen oder unvollständigen Proteinen, als auch wenn die Aminosäuren in den Kreislauf auf dem normalen Wege der Darmresorption gelangen oder auf dem parenteralen Wege in ihn eingeführt werden; die Dinge ändern sich auch nicht, wenn die Aminosäuren einen endogenen Ursprung haben und in den Geweben selbst infolge Zerstörung der Proteine erzeugt werden, sowohl unter den — man gestatte mir den Ausdruck — physiologischen Bedingungen des Hungerns als unter den pathologischen des Fiebers oder der die Azoturie verursachenden Intoxikationen. Nur bei den schweren Veränderungen der Leber nimmt das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ zu, was man versteht, wenn man bedenkt, daß die Leber das speziell für die Desamidierung der Aminosäuren bestimmte Organ ist.

Nun besteht aber die fundamentale Frage darin, den Grund dieser relativen Konstanz des Verhältnisses $\frac{N_a}{N_t}$ im Harn zu erklären. Warum entgeht immer ein proportionaler Teil der in den Kreislauf gelangenden Aminosäuren der Oxydation?

In dieser Hinsicht lassen sich meiner Ansicht nach zwei Hypothesen aufstellen.

Die erste ist die, daß in allen Eiweißstoffen in ungefähr gleichen Verhältnissen für jedes Protein eine schwer oxydierbare Aminosäure enthalten ist, so daß diese fast immer der Oxydation entgeht und in den Harn übergeht. Man versteht alsdann bei dieser Hypothese, daß, wenn beim Hunde das

Doppelte eines Proteins oder das Doppelte eines Hydrolysates von einem Protein eingeführt oder aus irgendeinem Grunde das Doppelte der Proteine der Gewebe des Tieres zerstört wird, auch die Menge der nicht oxydierbaren Aminosäure, die in den Harn übergeht, verdoppelt wird.

Verweilen wir noch bei dieser Hypothese; es bliebe noch zu bestimmen, welches die wenig oder gar nicht oxydierbare Aminosäure ist, und das könnte man vielleicht tun, wenn man versuchte, bei einem Hunde die einzelnen Aminosäuren isoliert einzuführen und zu sehen, wie hoch das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ steigt. Experimente, die denen Abderhaldens und seiner Mitarbeiter glichen (ich habe einige Resultate dieser Forscher auf S. 485 angeführt), könnten uns in dieser Hinsicht Aufklärung verschaffen und einstweilen würden die schon erwähnten Zahlen uns sagen, daß das Glykokoll und das Alanin die Aminosäuren sein könnten, die am leichtesten in den Harn übergehen. Aber wenigstens bezüglich des Glykokolls liegen wieder andere Untersuchungen vor, nach denen man annehmen muß, daß das Glykokoll leicht desamidiert wird, so daß es die Erzeugung von Harnstoff (Stolte) oder Ammoniak (Salaskin und Kowalewski) erhöht. Übrigens darf man diesen Resultaten Abderhaldens und seiner Mitarbeiter nicht allzu großes Gewicht beilegen, denn sie bemerken selbst, daß die Hunde sich unter den gleichen Bedingungen hinsichtlich der Verwendung der einzelnen Aminosäuren verschieden verhalten. Ferner ist es höchst wahrscheinlich, daß die Einführung einer einzigen Aminosäure die Bedingungen der Verwendung dieser stickstoffhaltigen Stoffe sehr verschiebt und daß, um ihre normale Verwendung zu erhalten, die Anwesenheit eines Gemisches von ihnen erforderlich ist. So z. B. ergibt sich stets aus den eben besprochenen Experimenten, daß die Einführung von Alanin allein bei einem Hunde das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ bis auf 23 erhöht, während nach Einführung eines Gemisches von Alanin, Tyrosin und Cystin das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ nur 1,5 ist, also nicht von den Werten abweicht, die nach meiner Ansicht die Norm darstellen.

Die zweite Hypothese ließe sich so formulieren, daß die Enzymreaktion, infolge der die Desamidierung der Aminosäuren

(die fundamentale chemische Erscheinung für die Oxydation dieser Stoffe) eintritt, eine Gleichgewichtsreaktion und so beschaffen ist, daß sie in jedem Augenblick eine der Gesamtmenge dieses Stoffes proportionale Menge des umzuwandelnden Stoffes nicht umgewandelt läßt. Um diese Hypothese besser zu erklären, könnte man z. B. sagen, daß, wenn die Konzentration der Aminosäuren in dem mit dem aminolytischen Ferment in Berührung kommenden Blute 10 ist, die Desamidierung erfolgt, bis eine Menge von Aminosäuren gleich der Konzentration 0,1 nicht umgewandelt bleibt; wenn die Konzentration der Aminosäuren im Blute 20 ist, bleibt eine der Konzentration 0,2 gleiche Menge von ihnen nicht umgewandelt, und so fort.

Wie man leicht versteht, gehen in den Harn über sowohl der aus den zerstörten Aminosäuren stammende Stickstoff in Gestalt von Harnstoff als auch die unveränderten Aminosäuren, und deshalb die Konstanz des Verhältnisses $\frac{N_a}{N_t}$.

Diese Hypothese ist hinlänglich annehmbar, wenn man berücksichtigt, daß bei vielen Enzymreaktionen die Erscheinung eintritt, daß ein Teil von nicht umgewandeltem Stoff, der dem umgewandelten proportional ist, zurückbleibt.

Weitere Versuche werden vielleicht eine tatsächliche Grundlage für die eine oder andere dieser Hypothesen schaffen, und die zweite könnte durch quantitative Untersuchungen über die Wirkung — in vitro — des aminolytischen Leberfermentes auf die Aminosäuren geprüft werden.

Einstweilen muß ich mich darauf beschränken, diese beiden Hypothesen auszusprechen, indem ich mir vorbehalte, auf dieses Thema zurückzukommen.

Zusammenfassung.

1. Es wurde bei Hunden der Wert des Verhältnisses $\frac{N_a}{N_t}$ (N_a-Menge des mit dem Harn in 24 Stunden ausgeschiedenen Aminstickstoffes; N_t = Menge des mit dem Harn in 24 Stunden ausgeschiedenen Gesamtstickstoffes) unter verschiedenen normalen und pathologischen Bedingungen bestimmt.

2. Beim Hungern schwankt der Wert dieses Verhältnisses zwischen 1,09 und 1,30.

3. Bei der Zunahme der Oxydationsvorgänge, die eintritt, wenn man den Hund mehrere Stunden lang reinen Sauerstoff einatmen läßt, zeigt sich leichte Azoturie und die Stickstoffbilanz erleidet Verluste. Das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ zeigt keine bemerkenswerten Veränderungen und bleibt zwischen 1 und 2,3.

4. Der Wert des Verhältnisses $\frac{N_a}{N_t}$ wurde bei Hunden bestimmt, die mit verschiedenen Eiweißstoffen, nämlich mit Casein, Gelatine, Glutinen und Zein ernährt wurden. Dieser Wert schwankte immer um 1 herum.

5. Nach der Einführung von Hydrolysaten von Gelatine, Casein und Zein auf subcutanem Wege veränderte sich das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ nicht auf bemerkenswerte Weise und blieb zwischen 2,51 und 1,57.

6. Beim Fieber, auch wenn beträchtliche Azoturie vorhanden war und zunahm, bis die Ausscheidung des Gesamtstickstoffes sich verdoppelte, nahm auch die Ausscheidung der Aminosäuren zu und das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ blieb zwischen den Grenzen 1,0 und 1,98.

Nur ausnahmsweise wurden zwei mehr abweichende Werte erhalten (11. und 16. Experiment). Auch während des Fiebers und des Hungerns, als der ganze Überschuß der Stickstoffausscheidung sicher endogenen Ursprungs war, blieb das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ in denselben Grenzen.

7. Bei der die Phosphorvergiftung begleitenden Azoturie beobachtet man in einigen Tagen eine Erhöhung des Verhältnisses $\frac{N_a}{N_t}$ bis auf 3,66.

8. Man sieht also, daß bei Hunden das Verhältnis $\frac{N_a}{N_t}$ danach strebt, konstant zu bleiben, oder, besser gesagt, zwischen den ziemlich engen Grenzen 1 und 2 schwankt, und zwar sowohl wenn man bei den Hunden auf gastrischem Wege tierische oder pflanzliche Proteine von verschiedener Natur oder auf parenteralem Wege die Hydrolysate dieser Proteine einführt, als auch wenn die Aminosäuren im Organismus einen endogenen

Ursprung haben und von Zerstörungen der Proteine stammen, die auch durch Krankheitsursachen veranlaßt werden.

9. Um diese Konstanz des Verhältnisses $\frac{N_a}{N_t}$ zu erklären, die uns anzeigt, daß immer ein proportionaler Teil der aus irgendeinem Protein stammenden Aminosäuren der Oxydation entgeht und in den Harn übergeht, lassen sich zwei Hypothesen aufstellen.

Die erste ist die, daß bei irgendwie hervorgerufenen Spaltungen eines beliebigen Proteins sich stets ein und dieselbe Menge einer schwer oxydierbaren und vom Organismus verwendbaren Aminosäure bildet.

Die zweite Hypothese ließe sich in der Weise formulieren, daß die Enzymreaktion, infolge welcher die Desamidierung der Aminosäuren eintritt, eine Gleichgewichtsreaktion und so beschaffen ist, daß sie in jedem Augenblick eine der Gesamtmenge dieses Stoffes proportionale Menge des umzuwandelnden Stoffes nicht umgewandelt läßt.

Protokoll der Experimente.

Tabelle VII.

Nummer des Experimentes	Bedingungen des Experimentes	Harnmenge	In 24 Stunden ausgeschiedener Stickstoff in Gramm				Eingeführter Stickstoff	Durch d. Faeces ausgeschiedener Stickstoff	Ausgeschiedener Gesamtstickstoff	Stickstoff-Bilanz
		ccm	N_t	N_a	$\frac{N_a}{N_t} \cdot 100$	N-Ammoniak	g	g	g	g
1	Der Hund atmet atmosphär. Luft ein	360	2,90	0,036	1,24	0,23	3,85	0,47	3,37	+ 0,48
1	Der Hund atmet 300 l Sauerstoff in 3 St. ein	445	2,86	0,070	2,40	0,19	3,85	0,40	3,26	+ 0,59
2	Der Hund atmet atmosphär. Luft ein	425	3,55	0,038	1,08	0,13	3,85	0,23	3,78	+ 0,07
2	Der Hund atmet 800 l Sauerstoff in 7 St. ein	350	3,93	0,041	1,04	0,24	3,85	0,68	4,56	− 1,31
3	Der Hund atmet atmosphär. Luft ein	335	3,75	0,082	2,10	0,28	4,20	0,41	4,16	+ 0,04
3	Der Hund atmet 800 l Sauerstoff in 6 St. ein	250	3,98	0,094	2,40	0,23	4,20	0,40	4,38	− 0,18

Tabelle VIII.

Datum	Nr. des Versuchs	Gewicht des Hundes	Kost	Eingeführter N g	In 24 St. ausgeschiedene Harnmenge g	N_t g	N_a g	$\frac{N_a}{N_t} \cdot 100$ g	N-Ammoniak g	Bemerkungen
5. VI.	4	4,950	—	—	150	1,206	—	—	—	Hunger
6. "		4,850	—	—	55	0,914	—	—	—	Hunger
7. "		4,900	Casein	2,75	250	1,775	0,0280	1,591	0,220	Der Hund wird mit 80 g
8. "		4,950	"	2,75	240	1,209	0,0168	1,388	0,168	Käse und 20 g Fett pro
9. "		4,980	"	2,75	340	1,923	0,0143	0,750	0,180	die gefüttert
31. V.	5	5,300	—	—	160	0,700	—	—	—	Hunger
1. VI.		5,120	—	—	190	0,723	—	—	—	Hunger
2. "		5,000	Gelatine	2,75	380	2,602	0,0314	1,207	0,106	Der Hund wird mit 22 g
3. "		5,120	"	2,75	185	2,690	0,0291	1,080	0,108	Gelatine und 20 g Fett
4. "		5,050	"	2,75	210	2,880	0,0331	1,150	0,240	gefüttert
9. VI.	6	7,120	—	—	190	1,003	—	—	—	Hunger
10. "		6,920	—	—	200	1,005	—	—	—	Hunger
11. "		7,040	Glutin	3,00	190	2,964	0,0210	0,726	0,214	Der Hund wird mit 60 g
12. "		7,050	"	3,00	290	3,480	0,0241	0,705	0,247	Glutinbrei und 20 g Fett
13. "		6,850	"	3,00	350	2,245	0,0190	0,863	0,230	gefüttert
24. V.	7	5,650	—	—	80	0,833	—	—	—	Hunger
25. "		5,550	—	—	240	1,034	—	—	—	Hunger
27. "		5,360	—	—	290	0,781	—	—	—	Hunger
28. "		5,470	Zein	2,73	150	2,007	0,0240	1,200	0,202	Der Hund wird mit 230 g
29. "		5,550	"	2,73	200	2,23	0,0264	1,118	0,290	Maisbrot und 20 g Fett
30. "		5,550	"	2,73	280	2,37	0,0274	1,207	0,256	gefüttert

Tabelle IX.

Datum	Nr. des Versuchs	Gewicht des Hundes	Temperatur °C	Eingeführter N g	In 24 St. ausgeschiedene Harnmenge g	N_t g	N_a g	$\frac{N_a}{N_t} \cdot 100$ g	N-Ammoniak g	Bemerkungen
24. V.	8	5,650	—	—	80	0,833	0,0123	1,481	0,0459	
25. "		5,550	—	—	240	1,034	0,0134	1,330	0,0604	
26. "		5,550	—	—	215	2,730	0,0414	1,509	0,1760	Dem Hunde werden 100 ccm
27. "		5,360	—	—	290	0,781	0,0101	1,340	0,1700	Zeinhydrolysat unter die Haut eingespritzt (N_t 0,242 g,
10. VI.	9	4,900	—	—	150	1,209	0,0113	0,940	0,0161	N_a 0,221 g)
11. "		4,860	—	—	280	4,228	0,0700	1,675	0,325	Dem Hunde werden 100 ccm
5. I.	10	6,140	38,7	3,00	300	2,52	0,040	1,600	0,310	Caseinhydrolysat unter die Haut eingespritzt (N_t 1,2 g,
6. "		6,150	38,8	3,00	335	2,77	0,042	1,555	0,341	N_a 0,85 g)
7. "		6,090	39,2	3,00	325	4,34	0,065	1,511	0,423	Dem Hunde werden 100 ccm
8. "		6,150	38,9	3,00	300	3,20	0,033	1,031	0,272	Gelatinehydrolysat unter die
9. "		6,150	38,9	3,00	445	2,76	0,037	1,370	0,294	Haut eingespritzt (N_t 1,7 g, N_a 0,87 g

Tabelle X.

Datum	Nr. des Versuchs	Gewicht des Hundes	Temperatur °C	In 24 Std. ausgeschied. Harnmenge ccm	Eingeführter N g	N_t g	N_a g	$\frac{N_a}{N_t} \cdot 100$ g	N-Ammoniak g	Bemerkungen
14. IV.	11	5,750	38,6	360	3,4	3,38	0,059	1,78	0,17	
15. „		5,700	40,6	400	3,4	4,60	0,134	2,91	0,30	Idiopatisches Fieber
16. „		5,660	38,9	450	3,4	3,92	0,022	0,56	0,23	
17. „		5,650	39,1	275	3,4	3,79	0,015	0,40	0,27	
22. III.	12	5,800	39,3	370	3,4	3,36	0,067	2,03	0,18	
23. „		5,800	38,7	280	3,4	3,00	0,054	1,84	0,15	
24. „		5,920	40,3	1100	3,4	4,10	0,061	1,48	0,32	Das Fieber wurde durch intraperitoneale Einspritzung von 800 ccm Kochsalzlösung erzeugt
25. „		5,800	39,1	410	3,4	3,48	0,034	1,00	0,23	
26. „		5,720	38,5	240	3,4	2,56	0,047	1,86	0,17	
2. IV.	13	5,700	39,0	395	3,4	3,06	0,049	1,63	0,19	
3. „		6,000	39,8	800	3,4	3,90	0,039	1,00	0,25	idem
4. „		5,700	38,7	730	3,4	3,38	0,051	1,54	0,17	
5. „		5,700	38,8	300	3,4	3,09	0,057	1,85	0,16	
11. IV.	14	5,600	39,0	355	3,4	3,08	0,058	1,94	0,16	
12. „		5,820	39,4	880	3,4	3,46	0,043	1,26	0,24	idem
13. „		5,700	39,0	530	3,4	3,91	0,081	2,07	0,19	
14. „		5,750	38,6	360	3,4	3,38	0,059	1,78	0,17	
10. I.	15	6,150	38,8	370	4,2	3,78	0,041	1,11	0,17	
11. „		6,125	38,8	315	4,2	4,00	0,044	1,10	0,19	
12. „		6,050	39,6	270	4,2	4,38	0,064	1,48	0,21	Das Fieber wurde durch Einspritzung unter die Haut von 5 ccm von Streptokokkustoxin erzeugt
23. II.	16	5,750	39,0	345	4,2	3,93	0,066	1,69	0,27	
24. „		5,750	39,0	320	4,2	3,77	0,067	1,71	0,23	
25. „		5,700	40,9	360	4,0	4,45	0,120	2,50	0,23	Das Fieber wurde durch zwei Einspritzungen von je 2 ccm und 5 ccm Pestnucleoproteid erzeugt
26. „		5,820	39,7	170	3,8	3,40	0,077	2,27	0,23	
27. „		5,800	39,2	260	3,8	3,44	0,072	2,11	0,22	
28. „		5,650	38,2	325	3,4	3,06	0,068	2,20	0,19	
9. II.	17	5,700	39,4	355	3,4	3,72	0,054	1,45	0,23	
10. „		5,850	40,2	225	3,4	3,40	0,047	1,38	0,20	idem
11. „		5,710	38,9	425	3,4	3,47	0,050	1,46	0,25	
12. „		5,750	38,5	340	3,4	3,33	0,066	2,00	0,26	
23. IV.	18	6,700	38,5	235	3,4	2,64	0,036	1,37	0,12	
24. „		6,710	38,6	180	3,4	2,94	0,037	1,27	0,15	
25. „		6,720	39,5	400	3,4	5,84	0,078	1,31	0,34	idem
26. „		6,700	39,2	325	3,4	3,72	0,059	1,59	0,23	
23. VI.	19	4,630	39,3	120	—	0,860	0,0103	1,19	0,072	
24. „		4,570	39,4	100	—	0,800	0,0098	1,25	0,033	
25. „		4,570	39,7	220	—	1,119	0,0092	0,82	0,073	idem Der Hund hungert
26. „		4,570	40,3	200	—	1,018	0,0112	1,11	0,033	
27. „		4,500	39,8	400	—	2,419	0,0280	1,16	0,242	

Tabelle X (Fortsetzung).

Datum	Nr. des Versuchs	Gewicht des Hundes	Temperatur °C	In 24 Std. ausgeschied. Harnmenge ccm	Eingeführter N g	N_t g	N_a g	$\frac{N_a}{N_t} \cdot 100$ g	N-Ammoniak g	Bemerkungen
28. VI.	19	4,350	39,5	260	—	1,149	0,0109	0,95	0,104	
29. „		4,290	39,4	320	—	1,379	0,0142	1,03	0,095	
16. VI.	20	3,700	39,4	100	—	0,791	0,0112	1,41	0,053	
17. „		3,620	39,4	110	—	0,702	0,0100	1,42	0,093	
18. „		3,530	39,4	200	—	0,694	0,0091	1,31	0,084	
19. „		3,420	40,8	210	—	0,729	0,0147	1,76	0,050	
20. „		3,400	39,8	290	—	1,055	0,0169	1,60	0,105	
21. „		3,370	39,5	200	—	0,728	0,0112	1,55	0,072	
22. „		3,330	39,5	280	—	0,814	0,0123	1,51	0,094	
17. III.	21	5,750	38,5	340	3,4	3,33	0,066	2,00	0,26	
18. „		5,800	38,8	290	3,4	3,01	0,049	1,41	0,18	Dem Hunde werden 50 ccm einer 1%igen Benzoesäurelösung eingespritzt
19. „		5,780	39,5	330	3,4	3,92	0,078	2,00	0,28	
20. III.	22	5,850	39,3	370	3,4	3,58	0,062	1,82	0,22	
21. „		5,850	40,0	330	3,4	4,55	0,046	1,02	0,10	Dem Hunde werden 50 ccm einer 9%igen Lösung von benzoesauren-Natrium eingespritzt
22. „		5,800	39,3	370	3,4	3,36	0,067	2,02	0,18	
15. IV.	23	3,400	38,7	280	3,5	3,45	0,037	1,09	0,12	
17. „		3,350	38,8	175	3,5	3,95	0,036	0,93	0,17	Einspritzung von 1 ccm einer 1‰igen Phosphorsäurelösung in Mandelöl
18. „		3,260	38,8	240	3,5	4,29	0,036	0,86	0,14	0,5 ccm
19. „		3,100	38,5	150	0,75	3,63	0,048	1,33	0,10	0,5 ccm
20. „		3,020	38,2	215	0,50	3,22	0,117	3,66	0,096	
21. „		2,980	37,2	190	—	2,45	0,048	2,00	0,16	
27. V.	24	2,900	38,6	230	2,6	1,72	0,017	1,00	0,08	
28. „		2,900	38,5	230	2,6	1,72	0,017	1,00	0,08	
29. „		2,870	38,5	260	2,6	2,04	0,018	0,90	0,10	Einspritzung von 0,5 ccm einer 1‰igen Phosphorsäurelösung in Mandelöl
30. „		2,850	38,4	260	2,6	2,04	0,018	0,90	0,10	idem
31. „		2,840	38,6	310	2,6	2,15	0,017	0,81	0,13	idem
1. „		2,870	38,3	155	2,6	2,53	0,021	0,85	0,16	idem
2. „		2,850	38,5	150	2,0	2,35	0,044	2,04	0,14	
3. „		2,720	38,4	200	2,0	2,49	0,028	1,13	0,17	
4. „		2,580	38,7	180	1,0	2,52	0,075	2,85	0,12	
5. „		2,500	38,2	220	1,0	3,03	0,092	3,04	0,15	

Autorenverzeichnis.





